

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT

## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C07K 7/06, 7/08, G01N 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/04563  (43) 国際公開日 1994年3月3日 (03.03.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01142 (22) 国際出願日 1993年8月12日 (12. 08. 93)  (30) 優先権データ 特願平 4/237621 1992年8月14日 (14. 08. 92) JP 特願平 4/322237 1992年11月9日 (09. 11. 92) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 シノテスト (SHINO-TEST CORPORATION) (JP/JP) 〒102 東京都千代田区一番町10 東京機器化学ビル Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 山田晋吾 (YAMADA, Shingo) (JP/JP) 井上恵一 (INOUE, Keiichi) (JP/JP) 北島 恵 (KITAJIMA, Megumi) (JP/JP) 芳村 一 (YOSHIMURA, Hajime) (JP/JP) 〒229 神奈川県相模原市大野台二丁目29番14号 株式会社シノテスト 相模原事業所内 Kanagawa, (JP) 櫻林郎之介 (SAKURABAYASHI, Ikunosuke) (JP/JP) 〒330 埼玉県大宮市天沼町1-847 自治医科大学大宮医療センター内 Saitama, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目15番7号 TG115ビル7階 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US.  添付公開書類 国際調査報告
(54) Title : PEPTIDES CONTAINING RESPECTIVE AMINO ACID SEQUENCES SELECTED FROM AMONG THOSE OF LIPOPROTEIN(a) AND APOLIPOPROTEIN(a), ANTIBODIES RESPECTIVELY RECOGNIZING THESE AMINO ACID SEQUENCES, AND METHOD OF ASSAYING WITH THESE ANTIBODIES (54) 発明の名称 リポタンパク質(a)及びアポリポタンパク質(a)より選択されたアミノ酸配列を含むペプチド、これらのアミノ酸配列を認識する抗体、並びにこれらの抗体を用いる測定法 (57) Abstract <p>Amino acid sequences which have a specificity as a lipoprotein(a) and are lowly homologous with LDL and plasminogen are selected from among the amino acid sequences of the lipoprotein(a) to obtain antibodies against the lipoprotein(a) which specifically recognize these amino acid sequences. At least one of these antibodies is used in the immunoassay of the lipoprotein(a). Amino acid sequences which have a specificity as an apolipoprotein(a) and do not have antigenicities as the lipoprotein(a) and plasminogen are selected from among the amino acid sequences of the apolipoprotein(a) to obtain antibodies against the apolipoprotein(a) which specifically recognize these amino acid sequences. At least one of these antibodies is used in the immunoassay of the apolipoprotein(a). The invention serves to prepare antibodies against lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) more readily than the conventional methods and to conduct the immunoassay of the lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) accurately by using the antibodies.</p>		

(57) 要約

リボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より、リボタンパク質 (a) としての特異性を持ち、かつ LDL 及びプラスミノーゲンとは相同性が小さいアミノ酸配列を選び出し、これらのアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対する抗体を得る。これらの抗体のうち少なくとも 1 種類を、リボタンパク質 (a) の免疫学的測定法に使用する。

また、アポリボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より、アポリボタンパク質 (a) としての特異性を持ち、かつリボタンパク質 (a) 及びプラスミノーゲンとしての抗原性を持たないアミノ酸配列を選び出し、このアミノ酸配列を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体を得る。これらの抗体のうち少なくとも 1 種類を、アポリボタンパク質 (a) の免疫学的測定法に使用する。

従来法に比し簡便な操作によりリボタンパク質 (a) 及びアポリボタンパク質 (a) に対する抗体を得ることができ、これを用いることによりリボタンパク質 (a) 及びアポリボタンパク質 (a) の正確な測定が可能になる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	CS	チェッコスロヴァキア	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	CZ	チェッコ共和国	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	DK	デンマーク	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナ・ファソ	ES	スペイン	LU	ルクセンブルグ	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FI	フィンランド	LV	ラトヴィア	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	FR	フランス	MC	モナコ	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GA	ガボン	MG	マダガスカル	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GB	イギリス	ML	マリ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	TD	チャド
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	NE	ニジェール	US	米国
CI	コート・ジボアール	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド		

## 明 細 書

リポタンパク質 (a) 及びアポリポタンパク質 (a) より選択されたアミノ酸配列を含むペプチド、これらのアミノ酸配列を認識する抗体、並びにこれらの抗体を用いる測定法

## 技術分野

本発明は、動脈硬化症の危険因子であり臨床的に意義があるリポタンパク質 (a) の構成成分であるアポリポタンパク質 (a) より選択されたペプチド、リポタンパク質 (a) として若しくはアポリポタンパク質 (a) として又はそれらの構成部分よりなるペプチドについて認識する抗体を産生するための免疫原、リポタンパク質 (a) として若しくはアポリポタンパク質 (a) として又はそれらの構成部分よりなるペプチドについて認識する抗体、そしてこれらの抗体を用いるリポタンパク質 (a) 又はアポリポタンパク質 (a) の測定法に関する。

## 背景技術

リポタンパク質 (a) (lipoprotein (a)、Lp (a)) は、1963年ベルクにより $\beta$ -リポタンパク質の変異型として初めて報告された [K. Berg, Acta Pathol. Microbiol. Scand., 59, 369-382 (1963)]。その後種々の検討の結果、リポタンパク質 (a) は、通常生体内でコレステロールエステルの輸送を主な役割とする低密度リポタンパク質 (LDL) とリポタンパク質 (a) に特有なタンパク質であるアポリポタンパク質 (a) (apolipoprotein (a)、apo (a)、アポ (a)) からなり、LDLのタンパク質部分であるアポリポタンパク質 B-100とアポリポタンパク質 (a) との間でジスルフィド結合により結合した物質であることが判明した (図36参照)。

そして、アポリポタンパク質 (a) はプラスミノーゲンのクリングル4と呼ば

れる構造と相同性の高い部分を最大37個持ち、次いでプラスミノーゲンのクリングル5構造と相同性の高い部分、そしてプラスミノーゲンと相同性の高い部位を有するセリンプロテアーゼ構造部分から構成されている。なお、この37個のクリングルのうち28個は完全な繰り返し構造となっている。

また、リポタンパク質(a)にはイソ型(フェノタイプ)が存在することが報告され[G. Utermann et al., J. Clin. Invest., 80, 458-465 (1987), H. G. Kraft et al., Arteriosclerosis, 8, 212-216 (1988), G. Utermann et al., Hum. Genet., 78, 41-46 (1988)]、これはアポリポタンパク質(a)のクリングル4相当部分の繰り返し数の違いによるものと考えられており[V. N. Trieu et al., J. Biol. Chem., 266, 5480-5485 (1991)]、SDS電気泳動法と免疫ブロット法を用いた分画により、F型、B型、S1型、S2型、S3型、S4型及びO型が認められた[G. Utermann et al., J. Clin. Invest., 80, 458-465 (1987)]。

臨床的には狭心症や心筋梗塞をはじめとする虚血性心疾患患者でリポタンパク質(a)値が高値のものが多いたということが分かり[G. Dahlen et al., Acta Med. Scand., (Suppl.) 531, 1-29 (1972), K. Berg et al., Clin. Genet., 16, 347-352 (1979), G. M. Kostner et al., Atherosclerosis, 38, 51-61 (1981)]、そしてリポタンパク質(a)は、コレステロール、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール等の虚血性心疾患の既知の危険因子とは相関を示さず、動脈硬化症、虚血性心疾患の独立した新規な危険因子であることが報告された[C. Ehnholm et al., Biochim. Biophys. Acta,

236, 431-439 (1971), H. Schriewer et al., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 22, 591-596 (1984)]。

1987年、イートンら [D. L. Eaton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 84, 3224-3228 (1987)] は生化学的手法により、次いでマクリーンら [J. W. McLean et al., Nature, 330, 132-137 (1987)] はcDNA塩基配列よりアポリポタンパク質 (a) のアミノ酸配列を決定した。

これによりアポリポタンパク質 (a) はその分子構造の大部分が、線溶系に働くプラスミノーゲン分子と相同性の高い部分から構成されていることが判明した。

このことはリポタンパク質 (a) 及びアポリポタンパク質 (a) が、動脈硬化、リポタンパク質、血液凝固線溶系を同一視点で考えるうえでの重要な鍵となることを示唆するものである。

また、リポタンパク質 (a) が動脈硬化症の危険因子としてだけでなく、糖尿病性腎症あるいはPTCA (経皮的冠動脈内腔拡張術) 術後再狭窄をおこした人で高値を示す傾向があるということや、CRPのような急性反応性タンパク質と同様の挙動を示すという報告もあり、血液等の生体中のリポタンパク質 (a) 及びアポリポタンパク質 (a) を測定することは臨床的に重要な意義を持つものとなっており、リポタンパク質 (a) 及びアポリポタンパク質 (a) を正確に測定できる方法が望まれている。

リポタンパク質 (a) の測定は、単純免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動法、免疫比濁法、ラテックス比濁法、ラジオイムノアッセイ (RIA) [J. J. Albers et al., J. Lipid Res., 18, 331-338 (1977)]、及び酵素免疫測定法 (EIA、ELISA) [A.

Abe et al., Clin. Chim. Acta, 177, 31-40 (1988)]等の免疫学的測定法により行われているが、リポタンパク質(a)を免疫原として動物に免疫して得られる抗体をこれらの免疫学的測定法にそのまま使用すると、リポタンパク質(a)はその分子中にLDLを含みそしてプラスミノーゲンと相同性の高い部分を持つため、生体試料に含まれるLDLやプラスミノーゲンとも反応してしまい、LDLやプラスミノーゲンをも測りこんでしまうので、正確なリポタンパク質(a)の測定値を得ることができない。

そこで、リポタンパク質(a)からLDL部分を除いたアポリポタンパク質(a)を免疫原として用いてリポタンパク質(a)に対する抗血清(ポリクローナル抗体)を作製するという方法が報告されているが[G. M. Fless et al., J. Biol. Chem., 261, 8712-8718 (1986), G. Utermann et al., J. Biol. Chem., 265, 981-986 (1990)]、この方法により得られた抗血清(ポリクローナル抗体)はLDLとは交叉反応を起こさないものの、アポリポタンパク質(a)はプラスミノーゲンと相同性の高い部分を持つために、この抗血清(ポリクローナル抗体)はプラスミノーゲンとは交叉反応性を有する。

そのため、この抗血清(ポリクローナル抗体)はヒトプラスミノーゲンで吸収操作を行いプラスミノーゲンと反応する抗体を除去するという煩雑な操作を行わなければならない。

また、アポリポタンパク質(a)を特異的に測定する場合、つまりリポタンパク質(a)内のジスルフィド結合が切れた状態のアポリポタンパク質(a)を測定する場合には、アポリポタンパク質(a)を免疫原として調製した抗血清(ポリクローナル抗体)を前記の免疫学的測定法に適用する方法が考えられる。

しかし、アポリポタンパク質(a)を免疫原として調製した抗血清(ポリクローナル抗体)は、リポタンパク質(a)とも反応してしまうので、ヒトプラスミノーゲンによる吸収操作に加えてリポタンパク質(a)で吸収操作を行い、リポ

タンパク質 (a) と反応する抗体を除去する必要があるが、これは煩雑であるとともに、収率が低くなるため抗血清 (ポリクローナル抗体) を多量に得ることは難しいという欠点がある。

そして、このような操作によって調製されたりボタンパク質 (a) 又はアポリボタンパク質 (a) に対する抗血清及びポリクローナル抗体はロット差が非常に大きく、同一条件でリボタンパク質 (a) 又はアポリボタンパク質 (a) の測定を行った場合には、抗血清又はポリクローナル抗体のロットによって測定値に差が生じてしまうため、ロットごとに測定条件を設定し直す必要がある。

また、リボタンパク質 (a) 又はアポリボタンパク質 (a) を免疫原として、これらに対するモノクローナル抗体を調製し、LDL及びプラスミノーゲンと反応しない抗体産生細胞を選択する方法もあるが [D. L. Eaton et al., Clin. Chem., 36, 192-197 (1990), M. A. Lafferty et al., J. Lipid. Res., 32, 277-292 (1991)]、このような場合、得られた抗体産生細胞株のうち、リボタンパク質 (a) に特異的であってLDL及びプラスミノーゲンと交叉反応をおこさないという条件、あるいはアポリボタンパク質 (a) に特異的であってリボタンパク質 (a) 及びプラスミノーゲンと交叉反応をおこさないという条件を満足する抗体の産生細胞株は、数が少なく効率が悪く、非常に多数の抗体産生細胞株からこのような抗体の産生細胞株を選択することは、多くの労力と時間を要するものである。

更に、これらの抗血清、ポリクローナル抗体、又はモノクローナル抗体を得るための免疫原としてのリボタンパク質 (a) 又はアポリボタンパク質 (a) は、生体試料より精製しなければ得られず、その精製の操作は熟練を要し煩雑である。

そして、この免疫原であるリボタンパク質 (a) 及びアポリボタンパク質 (a) は安定性があまりよくなく、煩雑な操作を経て精製しても長期間保存する



ことが難しいという難点を有する。

また、抗体産生用の免疫原として用いるため、リボタンパク質（a）からLDL部分を除いてアポリリボタンパク質（a）を調製する際には、その処理の過程においてアポリリボタンパク質（a）が変性してしまい、ネイティブなアポリリボタンパク質（a）ではなくなっている可能性が高い。

よって、これらの従来のリボタンパク質（a）又はアポリリボタンパク質（a）に対する抗体、あるいはこれらの抗体を産生するための免疫原においては、上記のような複雑な吸収操作、ロット間差補正操作、抗体産生細胞株選択の操作、そして免疫原精製の操作等が必要であり、手間、時間、コストがかかるという問題を有している。

#### 発明の開示

上記のような現状に鑑みて本発明者らは、得られる抗体自身がLDL及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさず、そのため、LDL又はプラスミノーゲンに対する吸収操作、LDLそしてプラスミノーゲンと交叉反応のない抗体の産生細胞株の選択操作、ロット間差補正操作、そして免疫原精製の操作等の煩雑な操作を必要とせず、従来のもの・方法に比べ手間、時間、コストがかからずに得られる、リボタンパク質（a）を特異的に認識する抗体、これらの抗体を産生するための免疫原、これらの抗体を用いるリボタンパク質（a）の測定法、そしてリボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたペプチドの開発を課題とし、鋭意研究を行った。

また、本発明者らは、得られる抗体自身がリボタンパク質（a）及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさず、そのため、リボタンパク質（a）又はプラスミノーゲンに対する吸収操作、リボタンパク質（a）そしてプラスミノーゲンと交叉反応のない抗体の産生細胞株の選択操作、ロット間差補正操作、そして免疫原精製の操作等の煩雑な操作を必要とせず、従来のもの・方法に比べ手間、時間、

コストがかからずに得られる、アポリボタンパク質（a）を特異的に認識する抗体、これらの抗体を産生するための免疫原、これらの抗体を用いるアポリボタンパク質（a）の測定法、そしてアポリボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたペプチドの開発を課題とし、鋭意研究を行った。

その結果、本発明者らは本発明を完成するに至った。

#### 〔1〕 発明の概要

本発明は、以下の発明を包含する。

（1）リボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチド。

（2）アポリボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチド。

（3）配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質（a）に対する抗体を産生するための免疫原。

（4）免疫原が、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体とが結合したものである、前記（3）に記載の免疫原。

（5）配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質（a）に対する抗体を産生するための免疫原。

（6）免疫原が、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体とが結合したものである、前記（5）に記載の免疫原。

（7）配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50

以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリポタンパク質（a）に対する抗体を産生するための免疫原。

（8）免疫原が、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体とが結合したものである、前記（7）に記載の免疫原。

（9）配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリポタンパク質（a）に対するポリクローナル抗体。

（10）配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記（9）に記載のポリクローナル抗体。

（11）前記（3）に記載の免疫原より得られることを特徴とする前記（9）に記載のポリクローナル抗体。

（12）配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリポタンパク質（a）に対する抗体。

（13）配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記（12）に記載の抗体。

（14）前記（5）に記載の免疫原より得られることを特徴とする前記（12）に記載の抗体。

（15）モノクローナル抗体である前記（12）、（13）又は（14）に記載の抗体。

（16）配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリポタンパク質（a）に対する抗体。

（17）配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記（16）に記載の抗体。

（18）前記（7）に記載の免疫原より得られることを特徴とする前記（16）に記載の抗体。

（19）モノクローナル抗体である前記（16）、（17）又は（18）に記載の抗体。

(20) 前記 (9) ないし (15) のいずれかに記載の少なくとも 1 種類の抗体を用いることを特徴とするリボタンパク質 (a) の測定法。

(21) 前記 (16) ないし (19) のいずれかに記載の少なくとも 1 種類の抗体を用いることを特徴とするアポリボタンパク質 (a) の測定法。

## [2] 選択されたアミノ酸配列及びペプチド

本発明において、リボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択されたアミノ酸配列とは、リボタンパク質 (a) としての特異性を持ち、かつ LDL 及びプラスミノーゲンとは相同性が小さいという特徴を有するアミノ酸配列を、リボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選び出したものである。

このような特徴を有するアミノ酸配列及びそのアミノ酸配列の一部又は全体を含むペプチドは、リボタンパク質 (a) が持つ特異的な抗原性と同様の抗原性を示し、かつ LDL やプラスミノーゲンの抗原性は持たず、つまりリボタンパク質 (a) を特異的に認識する抗体を産生させることができる免疫原性を有しており、またリボタンパク質 (a) に対する抗体と特異的に結合することができ、よって、リボタンパク質 (a) を特異的に認識する抗体の決定に役立ち、リボタンパク質 (a) を特異的に認識する抗体を産生するための免疫原として、またリボタンパク質 (a) を免疫学的測定法により測定する時の標準物質として、そしてリボタンパク質 (a) を特異的に認識する抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製する場合のリガンドとして用いる等有用なものである。

また、本発明において、アポリボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択されたアミノ酸配列とは、アポリボタンパク質 (a) としての特異性を持ち、かつプラスミノーゲンとは相同性が小さいものであって、そして、リボタンパク質 (a) としての抗原性は持たないという特徴を有するアミノ酸配列を、アポリボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選び出したものである。

このような特徴を有するアミノ酸配列及びそのアミノ酸配列の一部又は全体を含むペプチドは、アポリボタンパク質 (a) が持つ特異的な抗原性と同様の抗原

性を示し、かつリポタンパク質（a）やプラスミノーゲンの抗原性は持たず、つまりアポリリポタンパク質（a）を特異的に認識する抗体を産生させることができる免疫原性を有しており、またアポリリポタンパク質（a）に対する抗体と特異的に結合することができ、よって、アポリリポタンパク質（a）を特異的に認識する抗体の決定に役立ち、アポリリポタンパク質（a）を特異的に認識する抗体を産生するための免疫原として、またアポリリポタンパク質（a）を免疫学的測定法により測定する時の標準物質として、そしてアポリリポタンパク質（a）を特異的に認識する抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより精製する場合のリガンドとして用いる等有用なものである。

さて、本発明における（1）リポタンパク質（a）としての特異性を持つ、（2）LDL及びプラスミノーゲンとは相同性が小さい、という2つの条件を満たすアミノ酸配列をリポタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択することにおいて、LDLの関与を排除するためにアポリリポタンパク質（a）のアミノ酸配列を対象とする必要がある。

また、本発明における（1）アポリリポタンパク質（a）としての特異性を持つ、（2）リポタンパク質（a）及びプラスミノーゲンとしての抗原性を持たない、という2つの条件を満たすアミノ酸配列もアポリリポタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択する。

そして、このようなアミノ酸配列は、アポリリポタンパク質（a）中になるべく多く繰り返されているアミノ酸配列より選択することが望ましい。なぜなら、このようなアミノ酸配列を含むペプチドを抗体産生用免疫原として用いた時に得られる抗体は、リポタンパク質（a）あるいはアポリリポタンパク質（a）に多数結合すると予想されるので、リポタンパク質（a）あるいはアポリリポタンパク質（a）の測定に有利であり、またリポタンパク質（a）あるいはアポリリポタンパク質（a）の種々のイソ型に対応できる可能性が高いからである。

このようなアミノ酸配列をアポリリポタンパク質（a）の4,529個のアミノ

酸よりなる配列から選択する。

ここで選択したアミノ酸配列をいくつかのセグメントに分けて検討をする。

タンパク質の立体構造の面から見た場合、抗体産生用免疫原等におけるその物質の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列としては、親水性が高くタンパク質分子表面に存在する可能性が高く、特殊な立体構造中に含まれず、そして空間的ゆらぎが大きく柔軟な構造に属する部分のアミノ酸配列が適していると考えられる。

よって、このような見地からそれぞれのセグメントの性質の推定を行う。

ホップらの方法 [T. P. Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78, 3824-3828 (1981)] 及びバーカーらの方法 [Parker et al., Biochemistry, 25, 5425-5432 (1986)] により各アミノ酸残基の親水性の高さの推定を行う。

また、ガーニャーらの方法 [Garnier et al., J. Mol. Biol., 120, 97-120 (1987)] により各アミノ酸残基について特殊な立体構造に属するかどうかの推定を行う。

そして、カープラスらの方法 [Karplus et al., Naturwissenschaften, 72, 212-213 (1985)] により各アミノ酸残基について空間的ゆらぎの大きい柔軟な構造に属するかどうかの推定を行う。

更に、スキャナーにより示されたアポリボタンパク質 (a) のアミノ酸残基の  $\alpha$ -ヘリックス構造の取りやすさの推定、及び  $\beta$  構造の取りやすさの推定の結果 [A. M. Scanu "Lipoprotein (a)", Academic Press, San Diego, 1990, p. 53~74.] を参考とすることもできる。

ここで得られた結果より、前記のような条件を満たすアミノ酸配列を有するセグメントを選択する。

そして、本発明におけるリボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたアミノ酸配列としては、この選択したセグメントのアミノ酸配列とプラスミノーゲンのアミノ酸配列を詳細に比較して相同性が小さいアミノ酸配列を選び、このうちリボタンパク質（a）に対する抗体を産生するための免疫原としての適性を持つアミノ酸配列を採用する。

本発明における配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列は前記のようにして選択することにより得られる。

また、本発明におけるアポリボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたアミノ酸配列としては、前記の選択したセグメントのアミノ酸配列とプラスミノーゲンのアミノ酸配列を詳細に比較して相同性が小さいアミノ酸配列を選択する。

そして次の段階として、これらのアミノ酸配列のリボタンパク質（a）としての抗原性を検討するために、これらのアミノ酸配列を含むペプチドを抗体産生用免疫原として抗体を調製し、得られた抗体とリボタンパク質（a）との反応性をウエスタンブロット法等で確認する。また、この抗体とアポリボタンパク質（a）との反応性をウエスタンブロット法等で確認する。

ここで得られた知見に基づき、リボタンパク質（a）と反応しない抗体の免疫原に含まれるアミノ酸配列を、リボタンパク質（a）としての抗原性を持たないアミノ酸配列として選択する。

このようにして選択されたアミノ酸配列を本発明におけるアポリボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたアミノ酸配列として採用する。

本発明における配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列は前記のようにして選択することにより得られる。

本発明における、リボタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドは、（1）リボタンパク質（a）と

しての特異性を有する、(2) LDL及びプラスミノーゲンとは相同性が小さい、という2つの条件を満たすものであって、リポタンパク質(a)に特異的な抗原性を示しながらLDLやプラスミノーゲンの抗原性は示さず、リポタンパク質(a)を特異的に認識する抗体の決定、そのような抗体を産生するための免疫原、リポタンパク質(a)測定時の標準物質、そしてリポタンパク質(a)を特異的に認識する抗体を精製する場合のリガンド等として有用なものである。

また、本発明における、アポリポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドは、(1)アポリポタンパク質(a)としての特異性を有する、(2)リポタンパク質(a)及びプラスミノーゲンとしての抗原性を持たない、という2つの条件を満たすものであって、アポリポタンパク質(a)に特異的な抗原性を示しながらリポタンパク質(a)やプラスミノーゲンの抗原性は示さず、アポリポタンパク質(a)を特異的に認識する抗体の決定、そのような抗体を産生するための免疫原、アポリポタンパク質(a)測定時の標準物質、そしてアポリポタンパク質(a)を特異的に認識する抗体を精製する場合のリガンド等として有用なものである。

本発明の、リポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチド、及びアポリポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドにおいて、アミノ酸配列の一部とは、配列番号1、配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列中の任意の連続したアミノ酸の配列のことであるが、3個のアミノ酸からなるアミノ酸配列を抗体は認識できるとの報告[F. Hudecz et al., J. Immunol. Methods, 147, 201-210 (1992)]があるので、配列番号1、配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列中の任



意の連続した3以上のアミノ酸の配列であることが好ましい。

そして、配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドとは、配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体よりなるペプチドに加えて、そのペプチドのN末端側又はC末端側又はN末端側とC末端側の両方に更にアミノ酸又はペプチドが結合したものも含むということを意味する。ここで結合するアミノ酸又はペプチドは、LDLやプラスミノゲンと相同性の高いアミノ酸配列を含まなければ特に制限されるものではない。但し、アミノ酸数が増えペプチドが大きくなると、LDLやプラスミノゲンとの相同性が生じてくる可能性があり、また立体構造が複雑となり特殊な立体構造を取る可能性があるので、本発明のペプチドは50以内のアミノ酸から構成されるのが好ましく、アミノ酸数が30以内であればより好ましい。

更に、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドとは、配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体よりなるペプチドに加えて、そのペプチドのN末端側又はC末端側又はN末端側とC末端側の両方に更にアミノ酸又はペプチドが結合したものも含むということを意味する。ここで結合するアミノ酸又はペプチドは、プラスミノゲンや、リポタンパク質(a)としての抗原性を有するアミノ酸配列と相同性の高いアミノ酸配列を含まなければ特に制限されるものではない。但し、アミノ酸数が増えペプチドが大きくなると、プラスミノゲンとの相同性やリポタンパク質(a)としての抗原性が生じてくる可能性があり、また立体構造が複雑となり特殊な立体構造を取る可能性があるので、本発明のペプチドは50以内のアミノ酸から構成されるのが好ましく、アミノ酸数が30以内であればより好ましい。

本発明における、リポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、

50以内のアミノ酸から構成されるペプチド、及びアポリポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドは、液相法及び固相等のペプチド合成の方法により合成することができ、またペプチド自動合成装置を用いてもよく、日本生化学会編「生化学実験講座1 タンパク質の化学IV」, 東京化学同人, 1975.、泉屋ら「ペプチド合成の基礎と実験」, 丸善, 1985.、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学下」, 東京化学同人, 1987.等に記載された方法に従い合成することができる。

そして、これらのペプチドは対応する配列を持つDNAより組換えDNA技術を用いて調製してもよく、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法I」, 東京化学同人, 1986.、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法II」, 東京化学同人, 1986.、日本生化学会編「続生化学実験講座1 遺伝子研究法III」, 東京化学同人, 1987.等を参照して調製を行えばよい。

### 〔3〕抗体産生用免疫原

本発明の、配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リポタンパク質(a)に対する抗体を産生するための免疫原において、配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドとは、前記の本発明の、リポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなるものである。

この本発明の、配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リ

ポタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原により、(1) リポタンパク質 (a) を特異的に認識する、(2) LDL 及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさない、という 2 つの条件を満たす抗体を得ることができる。

また、本発明の、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリポタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原において、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドとは、前記の本発明の、アポリポタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなるものである。

この本発明の、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリポタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原により、(1) アポリポタンパク質 (a) を特異的に認識する、(2) リポタンパク質 (a) 及びプラスミノーゲンは交叉反応を起こさない、という 2 つの条件を満たす抗体を得ることができる。

本発明における、配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リポタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原、及び配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリポタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原は、これらのペプチドそのものを抗体産生用免疫原として動物に免疫してもよいし、これらのペプチドと担体 (キャリア) を結合させたものを抗体産生用免疫原として動物に免疫してもよい。

なお、免疫原が低分子物質の場合には、担体と結合したものを免疫するのが一般的であるものの、アミノ酸数 5 のペプチドを免疫原としてこれに対する特異抗

体を産生させたとの報告〔木山ら「日本薬学会第112年会講演要旨集3」, 1992, p. 122.〕もあるので、担体を使用することは必須ではない。

担体を使用する場合には、スカシガイのヘモシアニン (KLH)、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン、ニワトリ血清アルブミン、ポリーL-リジン、ポリアラニルリジン、ジパルミチルリジン、破傷風トキソイド又は多糖類等の担体として公知なものを用いることができる。

そして、本発明のこれらのペプチドと担体の結合法は、グルタルアルデヒド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド法、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法又はジパルミチルリジン法等の公知の結合法を用いることができる。

また、ニトロセルロース粒子、ポリビニルピロリドン又はリポソーム等の担体に前記のペプチドを吸着させたものを抗体産生用免疫原とすることもできる。

なお、本発明の、配列表の配列番号1又は配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質(a)に対する抗体を産生するための免疫原、及び配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリリボタンパク質(a)に対する抗体を産生するための免疫原は、分子量が小さいこともあって安定であり、長期間保存可能なものである。

#### 〔4〕抗体

本発明における、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体、及び配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対する抗体は、LDL及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさず、リボタンパク質(a)を特異的に認識する抗体として用いることがで

きる。

前記リボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体及び抗体は、リボタンパク質 (a) 中のこれらのアミノ酸配列の一部又は全体に対して特異的に親和性を持つものであり、換言すれば特異的に結合性を有するものである。

そして、本発明の前記リボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体及び抗体は、リボタンパク質 (a) と特異的に結合できるが、配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体をそれぞれ含むペプチドあるいはタンパク質とも特異的に結合することができるものである。

なお、ここでのアミノ酸配列の一部とは、抗体が立体構造的に抗原の抗原決定基 (エピトープ) を認識することより考えれば、これらのアミノ酸配列中の一次構造上隣接したアミノ酸配列に限定されるものではなく、これらのアミノ酸配列中の任意の 3 以上のアミノ酸を意味するものとすべきである。

更に、本発明の前記リボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体及び抗体において、これらのアミノ酸配列をプラスミノーゲンとの相同性の低さという面から絞りこんで得られるアミノ酸配列としては、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列に対しては配列番号 4 のアミノ酸配列が、そして配列番号 2 のアミノ酸配列に対しては配列番号 5 のアミノ酸配列が、それぞれ挙げられる。

また、本発明における、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体は、リボタンパク質 (a) 及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさず、アポリボタンパク質 (a) を特異的に認識する抗体として用いることができる。

なお、本発明の配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体が、アポリボタンパク質 (a) をその分子内に含むリボタンパク質 (a) とは結合せず、リボタンパク質 (a) 内のジスルフィド結合が切れた状態のアポリボタンパク質 (a) を特異的に認識し結合する理由は、現在のところは確かなことは言えないが、立体構造

の違いによるものではないかと推測される。

この配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体は、アポリボタンパク質 (a) 中のこれらのアミノ酸配列の一部又は全体に対して特異的に親和性を持つものであり、換言すれば特異的に結合性を有するものである。

そして、本発明の配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体は、アポリボタンパク質 (a) と特異的に結合できるが、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体をそれぞれ含むペプチドあるいはタンパク質とも特異的に結合することができるものである。

なお、ここでのアミノ酸配列の一部とは、抗体が立体構造的に抗原の抗原決定基 (エピトープ) を認識することより考えれば、これらのアミノ酸配列中の一次構造上隣接したアミノ酸配列に限定されるものではなく、これらのアミノ酸配列中の任意の 3 以上のアミノ酸を意味するものとすべきである。

更に、本発明の配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体において、このアミノ酸配列をプラスミノーゲンとの相同性の低さという面から絞りこんで得られるアミノ酸配列としては、配列番号 6 のアミノ酸配列が挙げられる。

本発明の、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体、及び配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対する抗体は、それぞれ、配列表の配列番号 1 又は配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原を動物に免疫することにより得ることができる。

また、本発明の、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体

を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体は、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリボタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原を動物に免疫することにより得ることができる。

本発明の配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体は、ポリクローナル抗体そのもの、又はポリクローナル抗体よりなる抗血清のいずれのタイプのものでよく、またこれらの抗体のフラグメント (Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab' 等) も含むものである。

また、本発明の、配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対する抗体、及び配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質 (a) に対する抗体は、ポリクローナル抗体、ポリクローナル抗体よりなる抗血清、又はモノクローナル抗体のいずれのタイプのものでよく、またこれらの抗体のフラグメント (Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab' 等) も含むものである。

ポリクローナル抗体及び抗血清は以下の操作により調製することができる。

まず、前記の配列表の配列番号 1、配列番号 2 又は配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる抗体産生用免疫原 (担体は使用してもよいし、使用しなくてもよい) を哺乳動物 (マウス、ウサギ、ラット、ヒツジ、ヤギ、ウマ等) 又は鳥類 (ニワトリ等) に免疫する。

抗体産生用免疫原の免疫量は免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には約 5～10 週齢のマウス一匹当たり一回につき 0.1 μg～5 mg、好ましくは 50 μg～1 mg の前記ペプチドを含む量の抗体産生用免疫原を免疫注射する。また、ウサギの場合はウサギ一匹当たり一回につき 10 μg～数十 mg の前記ペプチドを含む量の抗体産生用免

疫原を免疫注射するのが好ましい。

なお、抗体産生用疫原はアジュバントを添加混合して免疫注射をすることが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、2～3週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に抗体産生用疫原を追加免疫注射する。この場合も抗体産生用疫原はアジュバントを添加混合して追加免疫注射をすることが好ましい。

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら全採血を行い、血清を分離して抗血清を得る。

この抗血清を、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせて抗体の精製を行い、本発明におけるポリクローナル抗体を得ることができる。

なお、抗体産生用疫原に担体としてヒト血清アルブミン又はBSAを用いた場合は、得られた抗体あるいは抗血清中にヒト血清アルブミンと交叉反応を起こす抗体が含まれる可能性があるので、このような抗体の除去処理を行うことが好ましい。この除去処理方法としては、担体として用いたヒト血清アルブミン又はBSAを、得られた抗体あるいは抗血清の溶液中に添加して生成した凝集物を取り除くか、担体として用いたヒト血清アルブミン又はBSAを不溶化担体に固相化してアフィニティークロマトグラフィーにより除去する方法等を用いることができる。

次に、モノクローナル抗体の調製法について以下説明を行う。

モノクローナル抗体は、ケラーらの細胞融合法〔G. Koehler et



a1., Nature, 256, 495-497 (1975)] によるハイブリドーマ、又はエプスタンバーウイルス等のウイルスによる腫瘍化細胞等の抗体産生細胞により得ることができる。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の調製は、以下の操作により行うことができる。

まず、前記の配列表の配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる抗体産生用免疫原を哺乳動物（マウス、ヌードマウス、ラット等、例えば近交系マウスのBALB/c）又は鳥類（ニワトリ等）に免疫する。抗体産生用免疫原の免疫量は、免疫動物の種類、免疫注射部位等により適宜決められるものであるが、例えば、マウスの場合には一匹当たり一回につき0.1  $\mu$ g～5mgの前記ペプチドを含む量の抗体産生用免疫原を免疫注射するのが好ましい。

なお、抗体産生用免疫原はアジュバントを添加混合して免疫注射をすることが好ましい。アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、水酸化アルミニウムアジュバント又は百日咳菌アジュバント等の公知なものを用いることができる。

免疫注射は、皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に行えばよい。

初回免疫後、1～2週間間隔で皮下、静脈内、腹腔内又は背部等の部位に抗体産生用免疫原を追加免疫注射する。この追加免疫注射の回数としては2～6回が一般的である。この場合も抗体産生用免疫原はアジュバントを添加混合して追加免疫注射をすることが好ましい。

初回免疫の後、免疫動物の血清中の抗体価の測定をELISA法等により繰り返し行い、抗体価がプラトーに達したら、抗体産生用免疫原を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）に溶解したものを静脈内又は腹腔内に注射し、最終免疫とする。この最終免疫の3～5日後に、免疫動物の脾細胞、リンパ節細胞又は末梢リンパ球等の抗体産生能を有する細胞を取得する。

この免疫動物より得られた抗体産生能を有する細胞と哺乳動物（マウス、ヌードマウス、ラット等）の骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）とを細胞融合させるのであるが、ミエローマ細胞としてはヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ（HGPRT）又はチミジンキナーゼ（TK）等の酵素を欠損した細胞株のものが好ましく、例えば、BALB/cマウス由来のHGPRT欠損細胞株である、P3-X63-Ag8株（ATCC TIB9）、P3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク（JCRB）9085）、P3-NS1-1-Ag4-1株（JCRB 0009）、P3-X63-Ag8・653株（JCRB 0028）又はSP2/O-Ag-14株（JCRB 0029）などを用いることができる。

細胞融合は、各種分子量のポリエチレングリコール（PEG）、リボソーム又はセンダイウイルス（HVJ）等の融合促進剤を用いて行うか、又は電気融合法により行うことができる。

ミエローマ細胞がHGPRT欠損株又はTK欠損株のものである場合には、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジンを含む選別用培地（HAT培地）を用いることにより、抗体産生能を有する細胞とミエローマ細胞の融合細胞（ハイブリドーマ）のみを選択的に培養し、増殖させることができる。

このようにして得られたハイブリドーマの培養上清をELISA法やウェスタンブロット法等の免疫学的測定法により測定することにより、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質（a）に対する抗体、又は配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリボタンパク質（a）に対する抗体を産生するハイブリドーマを選択することができ、この方法と限界希釈法等の公知のクローニングの方法を組み合わせるにより、本発明におけるモノクローナル抗体の産生細胞株を単離して得ることができる。

このモノクローナル抗体産生細胞株を適当な培地で培養して、その培養上清が

ら本発明のモノクローナル抗体を得ることができるが、培地としては無血清培地又は低濃度血清培地等を用いてもよく、この場合は抗体の精製が容易となる点で好ましく、DMEM培地、RPMI 1640培地又はASF培地103等の培地を用いることができる。

また、モノクローナル抗体産生細胞株を、これに適合性がありプリスタン等であらかじめ刺激した哺乳動物の腹腔内に注入し、一定期間の後、腹腔にたまった腹水より本発明のモノクローナル抗体を得ることもできる。

このようにして得られたモノクローナル抗体は、硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム等による塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過法、又はアフィニティークロマトグラフィー等の方法、あるいはこれらの方法を組み合わせることにより、精製された本発明におけるモノクローナル抗体を得ることができる。

#### 〔5〕測定法

本発明における、(1)配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体、(2)配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記(1)のポリクローナル抗体、(3)配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質(a)に対する抗体を産生するための免疫原より得られることを特徴とする前記(1)のポリクローナル抗体、(4)配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対する抗体、(5)配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記(4)の抗体、(6)配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質(a)に対する抗体を

産生するための免疫原より得られることを特徴とする前記（４）の抗体、（７）モノクローナル抗体である前記（４）、（５）又は（６）の抗体、以上（１）ないし（７）のいずれかの抗体のうち、少なくとも１種類の抗体を用いることを特徴とするリポタンパク質（a）の測定法は、試料中のLDLやプラスミノーゲンを測りこんでしまうことがなく、リポタンパク質（a）の濃度を正確に測定することができる方法である。

また、本発明における、（１）配列表の配列番号３で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリポタンパク質（a）に対する抗体、（２）配列表の配列番号３で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号６で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする前記（１）の抗体、（３）配列表の配列番号３で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、５０以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリポタンパク質（a）に対する抗体を産生するための免疫原より得られることを特徴とする前記（１）の抗体、（４）モノクローナル抗体である前記（１）、（２）又は（３）の抗体、以上（１）ないし（４）のいずれかの抗体のうち、少なくとも１種類の抗体を用いることを特徴とするアポリポタンパク質（a）の測定法は、試料中のリポタンパク質（a）やプラスミノーゲンを測りこんでしまうことがなく、アポリポタンパク質（a）の濃度を正確に測定することができる方法である。

これらの本発明の測定法においては、前記の抗体のうち１種類の抗体を用いるだけでなく、複数種類の抗体を組み合わせ用いてもよい。

そして、本測定法は抗体を用いる測定法、即ち免疫学的測定法であれば、いずれの方法においてもその測定法で使用される抗体として、前記の抗体を用いることにより、所期の効果を奏するものであって、例えば、酵素免疫測定法（ELISA、EIA）、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、酵素抗体法、蛍光抗体法、免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応、粒子凝集反応又はウエスタンブロット法等により

本測定法は実施される。

本測定法における試料としては、血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、汗、腹水、羊水、又は細胞あるいは臓器の抽出液等、リボタンパク質（a）若しくはアポリタンパク質（a）又はそれらの構成部分が含まれる可能性のある生体試料であれば対象となる。

本測定法を酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、放射免疫測定法又は発光免疫測定法等の標識抗体を用いた免疫測定法により実施する場合には、サンドイッチ法又は競合法により行うこともでき、サンドイッチ法の場合には固相化抗体及び標識抗体等直接リボタンパク質（a）又はアポリタンパク質（a）と結合する抗体のうち少なくとも1種の抗体が前記の抗体であればよい。

固相担体としては、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ラテックス、ゼラチン、アガロース、セルロース、セファロース、ガラス、金属、セラミックス、又は磁性体等の材質よりなるビーズ、マイクロプレート、試験管、スティック、又は試験片等の形状の固相担体を用いることができる。

固相化抗体は、固相担体と抗体を物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの併用等の公知の方法により調製することができる。

標識物質としては、酵素免疫測定法の場合には、パーオキシダーゼ（POD）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、乳酸脱水素酵素又はアミラーゼ等を、蛍光免疫測定法の場合には、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート、置換ローダミンイソチオシアネート又はジクロロトリアジンイソチオシアネート等を、そして放射免疫測定法の場合には、トリチウム、ヨウ素125又はヨウ素131等を用いることができる。また、発光免疫測定法は、NADH-FMNH<sub>2</sub>-ルシフェラーゼ系、ルミノール-過酸化水素-POD系、アクリジニウムエステル系又はジオキセタン化合物系等を用いること

ができる。

標識物質と抗体との結合法は、グルタルアルデヒド法、マレイミド法、ピリジルスルフィド法又は過ヨウ素酸法等の公知の方法を用いることができる。

測定の方法は公知の方法〔日本臨床病理学会編「臨床病理臨時増刊特集第53号 臨床検査のためのイムノアッセイ技術と応用」，臨床病理刊行会，1983.，石川榮治ら編「酵素免疫測定法」，第3版，医学書院，1987.，北川常廣ら編「蛋白質核酸酵素別冊No. 31 酵素免疫測定法」，共立出版，1987.〕により行うことができる。

例えば、固相化抗体と試料を反応させ、同時に標識抗体を反応させるか、又は洗浄の後に標識抗体を反応させて、固相化抗体－リボタンパク質（a）－標識抗体、又は固相化抗体－アポリリボタンパク質（a）－標識抗体の複合体を形成させる。そして未結合の標識抗体を洗浄分離して、結合標識抗体量又は未結合標識抗体量より試料中のリボタンパク質（a）量、又はアポリリボタンパク質（a）量を測定することができる。

具体的には、酵素免疫測定法の場合は標識酵素にその至適条件下で基質を反応させ、その反応生成物の量を光学的方法等により測定する。蛍光免疫測定法の場合には蛍光物質標識による蛍光強度を、放射免疫測定法の場合には放射性物質標識による放射線量を測定する。発光免疫測定法の場合は発光反応系による発光量を測定する。

本測定法を免疫比濁法、ラテックス凝集反応、ラテックス比濁法、赤血球凝集反応又は粒子凝集反応等の免疫複合体凝集物の生成を、その透過光や散乱光を光学的方法により測るか、目視的に測る測定法により実施する場合には、溶媒としてリン酸緩衝液、グリシン緩衝液、トリス緩衝液又はグッド緩衝液等を用いることができ、更にポリエチレングリコール等の反応促進剤や非特異的反応抑制剤を含ませてもよい。

抗体を固相担体に感作させて用いる場合には、固相担体としては、ポリスチレ

ン、スチレンーブタジエン共重合体、(メタ)アクリル酸エステル類ポリマー、ラテックス、ゼラチン、リボソーム、マイクロカプセル、赤血球、シリカ、アルミナ、カーボンブラック、金属化合物、金属、セラミックス又は磁性体等の材質よりなる粒子を使用することができる。

この感作の方法としては、物理的吸着法、化学的結合法又はこれらの方法の併用等の公知の方法を使うことができる。

測定の操作法は公知の方法により行うことができるが、例えば、光学的方法により測定する場合には、試料と抗体、又は試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、エンドポイント法又はレート法により、透過光や散乱光を測定する。

また、目視的に測定する場合には、プレートやマイクロタイタープレート等の容器中で、試料と固相担体に感作させた抗体を反応させ、凝集の状態を目視的に判定する。

なお、目視的に測定する代わりにマイクロプレートリーダー等の機器を用いて測定を行ってもよい。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ホップらの方法による各アミノ酸残基の親水性の高さの推定のグラフである。

図2は、パーカーらの方法による各アミノ酸残基の親水性の高さの推定のグラフである。

図3は、ガーニャーらの方法による各アミノ酸残基が特殊な立体構造に属するかの推定のグラフである。

図4は、カープラスらの方法による各アミノ酸残基が空間的ゆらぎの大きい柔軟な構造に属するかの推定のグラフである。

図5は、実施例3で得られた合成ペプチドの高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分析結果である。

図6は、実施例3で得られた合成ペプチドの質量スペクトルである。

図7は、実施例4で得られた合成ペプチドのHPLCによる分析結果である。

図8は、実施例4で得られた合成ペプチドの質量スペクトルである。

図9は、実施例5で得られた合成ペプチドのHPLCによる分析結果である。

図10は、実施例5で得られた合成ペプチドの質量スペクトルである。

図11は、実施例9で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の配列表の配列番号8で示されるペプチドへの反応性を見たELISA法の結果である。

図12は、実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の配列表の配列番号9で示されるペプチドへの反応性を見たELISA法の結果である。

図13は、実施例9、実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のリボタンパク質(a)及びLDLへの反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図14は、実施例9、実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のプラスミノーゲンへの反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図15は、実施例11で得られたアポリタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の配列表の配列番号10で示されるペプチドへの反応性を見たELISA法の結果である。

図16は、実施例11で得られたアポリタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のアポリタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図17は、実施例11で得られたアポリタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のアポリタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法での陰性対照における電気泳動のパターンを示す写真である。



図18は、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のアポリポタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法での対照における電気泳動のパターンを示す写真である。

図19は、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のリポタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図20は、実施例9で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いた免疫比濁法によるリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフである。

図21は、実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いた免疫比濁法によるリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフである。

図22は、実施例9で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いたELISA法によるリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフである。

図23は、実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いたELISA法によるリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフである。

図24は、本発明のリポタンパク質(a)測定法に対するプラスミノーゲンの影響を見たグラフである。

図25は、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いたELISA法によるアポリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフである。

図26は、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体の配列表の配列番号8、配列番号9及び配列番号10で示されるペプチドへの反応性を見たELISA法の結果である。

図27は、実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体の配列表の配列番号8、配列番号9及び配列番号10で示されるペプチドへの反応性を見たELISA法の結果である。

図28は、実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のアポリポタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図29は、実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のアポリポタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法での陰性対照における電気泳動のパターンを示す写真である。

図30は、実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のアポリポタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法での対照における電気泳動のパターンを示す写真である。

図31は、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のリポタンパク質(a)への反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図32は、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のLDLへの反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図33は、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のプラスミノーゲンへの反応性を見たウエスタンブロット法における電気泳動のパターンを示す写真である。

図34は、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体を用いたELISA法によるリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフ

である。

図35は、実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体を用いたELISA法によるアポリポタンパク質(a)測定の検量線のグラフである。

図36は、リポタンパク質(a)の構造の概略図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこの実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 実施例1 リポタンパク質(a)よりのアミノ酸配列の選択

リポタンパク質(a)としての特異性を持ち、かつLDL及びプラスミノーゲンとは相同性が小さいという特徴を有する、リポタンパク質(a)の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列を、リポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択した。

(1) リポタンパク質(a)としての特異性を持ち、そしてLDL及びプラスミノーゲンとは相同性が小さい、という2つの条件を満たすアミノ酸配列をリポタンパク質(a)のアミノ酸配列より選択することにおいて、LDLの関与を排除するためにアポリポタンパク質(a)のアミノ酸配列を対象とした。

次に、アポリポタンパク質(a)の4,529個のアミノ酸配列〔J. W. McLean et al., Nature, 330, 132-137 (1987)〕について、なるべく多く繰り返されている配列を検討し、アポリポタンパク質(a)のN末端より110番目のセリンから3,306番目のトレオニンまでの配列の中で28回繰り返されているクリングル構造部分の配列表の配列番号7で示された120個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列を選択した。

(2) この配列番号7で示されたアミノ酸配列のN末端より3番目のアラニンから14番目のシステインまでをセグメント1、15番目のチロシンから35番

目のシステインまでをセグメント2、36番目のグルタミンから63番目のシステインまでをセグメント3、64番目のアルギニンから74番目のシステインまでをセグメント4、75番目のチロシンから86番目のシステインまでをセグメント5、87番目のアスパラギンから91番目のシステインまでをセグメント6、そして92番目のセリンから116番目のグルタミンまでをセグメント7と、システイン残基を主な基準として7つのセグメントに分けた。

(3) これらの7つのセグメントの性質を知るため、配列番号7で示された120個のアミノ酸配列について種々の検討を行った。

ホップらの方法 [T. P. Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 78, 3824-3828 (1981)] により各アミノ酸残基の親水性の高さの推定を行った。この結果を図1に示した。

図1において、横軸はアミノ酸残基のN末端側からの順番を表しており、縦軸は数値が大きい程そのアミノ酸残基の親水性が高く、数値が小さい程親水性が低いことを表している。

(4) 次に、バーカーらの方法 [Parker et al., Biochemistry, 25, 5425-5432 (1986)] によっても各アミノ酸残基の親水性の高さの推定を行った。この結果を図2に示した。

図2において、横軸はアミノ酸残基のN末端側からの順番を表し、縦軸は数値が大きい程親水性が高いことを表している。

(5) ガーニャーらの方法 [Garnier et al., J. Mol. Biol., 120, 97-120 (1987)] により各アミノ酸残基が特殊な立体構造に属するかどうかの推定を行った。この結果を図3に示した。

図3において、横軸はアミノ酸残基のN末端側からの順番を表し、縦軸は数値が大きい程そのアミノ酸残基が特殊な立体構造に属しにくいことを表している。

(6) カープラスらの方法 [Karplus et al., Naturwissenschaften, 72, 212-213 (1985)] により各アミ

ノ酸残基が空間的ゆらぎの大きい柔軟な構造に属するかどうかの推定を行った。  
この結果を図4に示した。

図4において、横軸はアミノ酸残基のN末端側からの順番を表し、縦軸は数値  
が大きい程そのアミノ酸残基が空間的ゆらぎの大きい柔軟な構造に属しやすいこ  
とを表している。

(7) そして、スキャナーにより示された、配列番号7のアミノ酸配列中の  
各アミノ酸残基における $\alpha$ -ヘリックス構造の取りやすさの推定、及び $\beta$ 構造  
の取りやすさの推定の結果 [A. M. Scanu "Lipoprotein  
(a)", Academic Press, San Diego, 1990,  
p. 53~74.] をも参考とした。

(8) 以上のデータを考察した結果、セグメント2は特殊な立体構造である $\beta$   
構造を取る可能性が高く、そしてセグメント5は疎水性が高いためタンパク質分  
子内部に埋没している可能性が高く、これらの2つのセグメントのアミノ酸配列  
は抗体産生用免疫原等の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列としては不適當であ  
ると考えられた。

また、セグメント6には糖が結合しているため抗原性を特異的に表すアミノ酸  
配列としては適當でなく、セグメント3のアミノ酸配列はプラスミノーゲンのア  
ミノ酸配列と相同性が高いため用いることはできない。

(9) よって、本発明における、リポタンパク質(a)としての特異性を持  
ち、かつLDL及びプラスミノーゲンとは相同性が小さいという特徴を有する、  
リポタンパク質(a)の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列としては、セグメン  
ト1、セグメント4及びセグメント7から選択するのが好ましく、プラスミノー  
ゲンのアミノ酸配列との相同性ができるだけ少なくなるように詳細に検討し、そ  
してリポタンパク質(a)に対する抗体の抗体産生用免疫原としての適性を検討  
した結果、配列表の配列番号1及び配列番号2で示されるアミノ酸配列を選択す  
るに至った。

## 実施例2 アポリポタンパク質 (a) よりのアミノ酸配列の選択

アポリポタンパク質 (a) としての特異性を持ち、かつリポタンパク質 (a) 及びプラスミノゲンとしての抗原性を持たないという特徴を有する、アポリポタンパク質 (a) の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列を、アポリポタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択した。

(1) アポリポタンパク質 (a) の4, 529個のアミノ酸配列 [J. W. McLean et al., Nature, 330, 132-137 (1987)] について、なるべく多く繰り返されている配列を検討し、アポリポタンパク質 (a) のN末端より110番目のセリンから3, 306番目のトレオニンまでの配列の中で28回繰り返されているクリングル構造部分の配列表の配列番号7で示された120個のアミノ酸よりなるアミノ酸配列を選択した。

(2) この配列番号7で示されたアミノ酸配列のN末端より3番目のアラニンから14番目のシステインまでをセグメント1、15番目のチロシンから35番目のシステインまでをセグメント2、36番目のグルタミンから63番目のシステインまでをセグメント3、64番目のアルギニンから74番目のシステインまでをセグメント4、75番目のチロシンから86番目のシステインまでをセグメント5、87番目のアスパラギンから91番目のシステインまでをセグメント6、そして92番目のセリンから116番目のグルタミンまでをセグメント7と、システイン残基を主な基準として7つのセグメントに分けた。

これらの7つのセグメントの性質を知るため、配列番号7で示された120個のアミノ酸配列について種々の検討を行ったが、この工程は実施例1の(3)から(7)の工程と同様にして行った。

(8) 以上のデータを考察した結果、セグメント2は特殊な立体構造である $\beta$ 構造を取る可能性が高く、そしてセグメント5は疎水性が高いためタンパク質分子内部に埋没している可能性が高く、これらの2つのセグメントのアミノ酸配列は抗体産生用免疫原等の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列としては不適當であ

と考えられた。

また、セグメント6には糖が結合しているため抗原性を特異的に表すアミノ酸配列としては適当でなく、セグメント3のアミノ酸配列はプラスミノゲンのアミノ酸配列と相同性が高いため用いることはできない。

(9) アポリポタンパク質(a)の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列としては、セグメント1、セグメント4及びセグメント7から選択するのが好ましく、プラスミノゲンのアミノ酸配列との相同性ができるだけ少なくなるように詳細に検討した結果、配列表の配列番号1、配列番号2及び配列番号3で示されるアミノ酸配列が候補として選択された。

(10) これらの配列表の配列番号1、配列番号2又は配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドのそれぞれを、アプライドバイオシステムズ社(Applied Biosystems)のモデル430Aペプチド自動合成装置(Model 430A peptide synthesizer)により、取扱説明書に従って、t-ブトキシカルボニルアミノ酸固相法で合成した。

(11) そして、これらの合成したペプチドを、担体であるスカシガイのヘモシアニン(KLH)〔カルビオケム社製〕と結合させて抗体産生用免疫原を調製し、8週齢のメスのBALB/cマウス(日本チャールズリバー社)に免疫してポリクローナル抗体を調製した。

(12) これらのポリクローナル抗体のリポタンパク質(a)への反応性を、タイタン・ジェル・リボ蛋白電気泳動キット(ヘレナ研究所社製)及びノバ・プロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット(ファルマシア・エルケービー社製)を用いてウエスタンブロット法により調べたところ、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドより調製されたポリクローナル抗体は、リポタンパク質(a)とは反応しないという結果が得られた。

(13) また、これらのポリクローナル抗体のアポリポタンパク質(a)への反応性を、4%SDS-ポリアクリルアミドゲル(テフコ社製)及びノバ・プロ

ット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット（ファルマシアーエルケービー社製）を用いてウエスタンブロット法により調べたところ、これらのすべての抗体がアポリポタンパク質（a）と反応することが判明した。

（14） よって、本発明における、アポリポタンパク質（a）としての特異性を持ち、かつリポタンパク質（a）及びプラスミノーゲンとしての抗原性を持たないという特徴を有する、アポリポタンパク質（a）の抗原性を特異的に表すアミノ酸配列として、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を選択した。

### 実施例3 配列表の配列番号8で示されるペプチドの合成

配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号8で示されるペプチドの合成を行った。

まず、アプライドバイオシステムズ社（Applied Biosystems）のモデル430Aペプチド自動合成装置（Model 430A peptide synthesizer）により、取扱説明書に従って、t-ブトキシカルボニルアミノ酸固相法で当該ペプチドの合成を行った。副反応を抑制するためスカベンジャーとして、ジメチルスルファイド、p-チオクレゾール、m-クレゾール、そしてアニソールの存在下でフッ化水素法により樹脂からの合成したペプチドの脱離を行った。

その後、ジメチルエーテルによりスカベンジャーを抽出し、そして2N酢酸により合成したペプチドの抽出を行った。

陰イオン交換樹脂であるダウエックス1-X2（DOWEX 1-X2）により陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行い精製をして、オクタデシル（ODS）カラムでの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、メインピークのパターンの確認を行った。

そして、エバポレーターにより凍結乾燥をして濃縮を行った後、HPLCにより精製を行い分取した。なお、このHPLC精製時の装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-D-ODS-5（20mm×300mm）



を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエーターで0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリルの0%から70%のグラジエントを流速7.0ml/分で行い、日本分光工業社製UVIDEC-100V型検出器(210nm、1.28AUFs)で検出を行った。

ここで精製分取した合成ペプチドをエバポレーターで凍結乾燥して濃縮した。

得られた合成ペプチドの純度をHPLCで分析した。装置及び条件は、山村化学研究所社の逆相ODSカラムYMC-R-ODS-5(4.9mm×300mm)を用い、日本分光工業社のTWINCLEポンプ及び日本分光工業社のGP-A40型グラジエーターで0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)中アセトニトリルの0%から70%のグラジエントを流速1.0ml/分、25分間で行い、日本分光工業社製UVIDEC-100V型検出器(210nm、1.28AUFs)で検出を行った。

この分析の結果を図5に示した。図5において、PKNOはチャート中のピークの番号、TIMEは溶出時間、AREAはピーク面積、CONCは全ピーク面積中のそのピーク面積の比率(即ちパーセント濃度)を表す。

これより得られた合成ペプチドの純度が100%であることが分かる。

また、得られた合成ペプチドのアミノ酸組成分析をミリポア社(Millipore)のウォータース(Waters)ピコータグ(Pico-Tag)アミノ酸分析装置により、取扱説明書に従って行った。なお、ペプチド試料の加水分解は、1%フェノールを含む6N塩酸中150℃で1時間行った。

このアミノ酸分析の結果を表1に示した。(塩酸加水分解法ではシステインは定量できないので、分析値は省略した。)

表 1

アミノ酸残基	合成されたペプチドのアミノ酸残基数	
	理 論 値	実 測 値
A s x	1	1.0
G l x	1	1.0
S e r	1	0.9
G l y	1	1.0
T h r	1	1.0
A l a	2	2.0
V a l	1	1.1

表1において、A s xはアスパラギン又はアスパラギン酸を表し、G l xはグルタミン又はグルタミン酸を表す。

これより得られた合成ペプチドが、配列表の配列番号8で示されるアミノ酸配列と同一の組成であり、配列表の配列番号8で示されるペプチドであることが確認された。なお、この得られた合成ペプチドの等電点は2.9であった。また、質量スペクトルを図6に示した。

#### 実施例4 配列表の配列番号9で示されるペプチドの合成

配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号9で示されるペプチドの合成を行った。

実施例3と同様にして、合成、精製、分析を行った。

得られた合成ペプチドの純度をHPLCで分析して得た結果を図7に示した。

図7において、P K N Oはチャート中のピークの番号、T I M Eは溶出時間、A R E Aはピーク面積、C O N Cは全ピーク面積中のそのピーク面積の比率（即ちパーセント濃度）を表す。

これより得られた合成ペプチドの純度がほぼ100%であることが分かる。

また、得られた合成ペプチドのアミノ酸組成分析の結果を表2に示した。

表 2

アミノ酸残基	合成されたペプチドのアミノ酸残基数	
	理 論 値	実 測 値
G l x	5	4.8
S e r	1	1.0
A r g	1	1.1
T h r	1	1.0
A l a	2	2.0
P r o	2	2.1

表2において、G l xはグルタミン又はグルタミン酸を表す。

これより得られた合成ペプチドが、配列表の配列番号9で示されるアミノ酸配列と同一の組成であり、配列表の配列番号9で示されるペプチドであることが確認された。なお、この得られた合成ペプチドの等電点は4であった。また、質量スペクトルを図8に示した。

#### 実施例5 配列表の配列番号10で示されるペプチドの合成

配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号10で示されるペプチドの合成を行った。

実施例3と同様にして、合成、精製、分析を行った。

得られた合成ペプチドの純度をHPLCで分析して得た結果を図9に示した。

図9において、P K N Oはチャート中のピークの番号、T I M Eは溶出時間、A R E Aはピーク面積、C O N Cは全ピーク面積中のそのピーク面積の比率（即ちパーセント濃度）を表す。

これより得られた合成ペプチドの純度がほぼ100%であることが分かる。

また、得られた合成ペプチドのアミノ酸組成分析の結果を表3に示した。

表 3

アミノ酸残基	合成されたペプチドのアミノ酸残基数	
	理 論 値	実 測 値
A s x	2	2. 0
A r g	1	1. 0
A l a	3	2. 7
P r o	2	2. 0
V a l	1	1. 0

表3において、A s xはアスパラギン又はアスパラギン酸を表す。

これより得られた合成ペプチドが、配列表の配列番号10で示されるアミノ酸配列と同一の組成であり、配列表の配列番号10で示されるペプチドであることが確認された。なお、この得られた合成ペプチドの等電点は5であった。また、質量スペクトルを図10に示した。

実施例6 配列表の配列番号8で示されるペプチドと結合した担体よりなる抗体産生用免疫原の調製

担体であるスカシガイのヘモシアニン (K L H) [カルбиоケム社製] 又はウシ血清アルブミン (B S A) [生化学工業社製] 10mgを10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH7. 0) に溶解し、これにN, N-ジメチルホルムアミドに溶解している2. 5%マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル (M B S) [ピアース社製] 溶液150 $\mu$ lを加え室温で攪拌しながら30分間反応させた。

これを4℃中に置いてある10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH7. 0) で平衡化しておいたゲル濾過カラムであるセファデックスG-25 (S e p h a d e x G-25) カラム [ファルマシア-エルケービー社製] にかき、280nmにおける吸光度でモニターして、M B S-担体結

合成分を分取した。

このMBS-担体結合成分をリン酸三ナトリウムでpH7.0に調整し、これに実施例3で合成した配列表の配列番号8で示されるペプチドを添加混合して150分間反応させた。

反応後、水に対して3回透析した後、凍結乾燥を行って、配列表の配列番号8で示されるペプチドと結合した担体よりなる抗体産生用免疫原を得た。

なお、担体がKLHの場合の収率は89%であり、担体がBSAの場合の収率は67%であった。

また、この抗体産生用免疫原中の配列表の配列番号8で示されるペプチドの割合（重量比）は、担体がKLHの場合で33%、担体がBSAの場合で27%であった。

実施例7 配列表の配列番号9で示されるペプチドと結合した担体よりなる抗体産生用免疫原の調製

実施例6と同様にして調製を行い、実施例4で合成したペプチドより、配列表の配列番号9で示されるペプチドと結合した担体よりなる抗体産生用免疫原を得た。

なお、担体がKLHの場合の収率は73%であり、担体がBSAの場合の収率は64%であった。

また、この抗体産生用免疫原中の配列表の配列番号9で示されるペプチドの割合（重量比）は、担体がKLHの場合で23%、担体がBSAの場合で25%であった。

実施例8 配列表の配列番号10で示されるペプチドと結合した担体よりなる抗体産生用免疫原の調製

実施例6と同様にして調製を行い、実施例5で合成したペプチドより、配列表の配列番号10で示されるペプチドと結合した担体よりなる抗体産生用免疫原を得た。

なお、担体がK L Hの場合の収率は75%であり、担体がB S Aの場合の収率は52%であった。

また、この抗体産生用免疫原中の配列表の配列番号10で示されるペプチドの割合（重量比）は、担体がK L Hの場合で30%、担体がB S Aの場合で21%であった。

実施例9 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリポタンパク質（a）に対するマウスポリクローナル抗体の調製

実施例6で得た抗体産生用免疫原（担体がK L Hのもの）を $360\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、8週齢のメスのBALB/cマウス（日本チャールズリバー社）の腹部皮下に $0.5\text{ml}$ を免疫注射した。

初回免疫から2週間後に、前記の抗体産生用免疫原を $180\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように生理食塩水で溶解し、フロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その $0.5\text{ml}$ により追加免疫注射を行った。この追加免疫注射は2週間おきに行った。

免疫動物であるこのマウスの血清中の抗体価を酵素免疫測定法（ELISA、EIA）にて1週間ごとに測定した。

このELISA法は、実施例6で得た抗体産生用免疫原（担体がB S Aのもの）をマイクロプレートに固相化し、これに免疫動物の血清を加えて反応させ、洗浄後更にパーオキシダーゼ（POD）標識抗マウスIgG抗体を加えて反応を行わせ、そして洗浄した後、過酸化水素と2, 2'-アジノービス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸）[ABTS]を含んだ発色液を加えて発色させて、EIAプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415nmの吸光度を測定して抗体価を求めるという操作法により行った。

追加免疫注射を5回行った後に、抗体価がプラトーに達したと認められたの

で、全採血を行い血清を分離して1.2 mlの抗血清を得た。

この抗血清を10,000 r. p. m. で30分間遠心分離を行い不溶物を除去した後、温度20℃で抗血清1 ml当り0.18 gの硫酸ナトリウムにより塩析を行った。

ここで得られた免疫グロブリンの沈澱画分をできるだけ少量の17.5 mMリン酸二水素ナトリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH 6.3)に溶解した後、この17.5 mMリン酸二水素ナトリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH 6.3)により十分に透析を行った。

透析後、17.5 mMリン酸二水素ナトリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液(pH 6.3)で平衡化しておいたDEAE－セルロースイオン交換カラム(セルバ社製)に通し素通り画分を分取することにより、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対するマウスポリクローナル抗体を得た。

なお、この得られた抗体の量はタンパク質量で1.0 mgであった。

参考例1 実施例9で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の配列表の配列番号8で示されるペプチドへの反応性

実施例9で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号8で示されるペプチドへの反応性をELISA法で確かめた。

(1) 実施例6で得られた抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)を5 µg/mlになるように生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)に溶解し、これを96ウェルマイクロプレート(ヌンク社製)に1ウェル当り100 µlずつ加え、37℃で2時間静置してペプチドの固相化を行った。

(2) このマイクロプレートを洗浄液(0.05%ツイーン20(Tween 20)を含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59 mMリン酸水素二ナトリウム、1.47 mMリン酸二水素カリウム、137 mM塩化ナトリウム、2.68 mM

塩化カリウム (pH 7.2)) で洗浄した後、1% BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.2) を1ウエル当り300 $\mu$ lずつ加えて、37℃で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

(3) これに、60 $\mu$ g/mlになるように3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で溶解した実施例9で得られたリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で2倍から2,048倍まで倍希釈をして希釈系列をつくり、それぞれを1ウエル当り100 $\mu$ lずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。

(4) また対照として、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で200倍に希釈した免疫をしていないマウスの血清を、3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で2倍から2,048倍まで倍希釈をして希釈系列をつくり、これらを(2)のマイクロプレートに1ウエル当り100 $\mu$ lずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。

(5) パーオキシダーゼ (POD) 標識抗マウスIgG抗体 (アマシャム社製) を3% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で2,000倍に希釈した後、

(3) 及び(4)のマイクロプレートに1ウエル当り100 $\mu$ lずつ加え、37℃で2時間静置して反応を行わせた。

(6) これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液 (3mM オーフェニレンジアミンを含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩衝液の1mlに対して2 $\mu$ lの1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの) を1ウエル当り100 $\mu$ lずつ加え、室温で反応させた。15分後に1ウエル当り50 $\mu$ lの6N硫酸を加えて反応を停止させた。

(7) これをEIAプレートリーダー (バイオラッド社製) にて492nmにおける吸光度の測定を行った。

この測定の結果を図11に示した。



この結果より、実施例9で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体が、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号8で示されるペプチドを特異的に認識して結合することが確かめられた。

実施例10 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対するマウスポリクローナル抗体の調製

実施例7で得た抗体産生用免疫原(担体がKLHのもの)を初回免疫時には500 $\mu$ g/mlになるように生理食塩水で溶解したことと、追加免疫時には250 $\mu$ g/mlになるように生理食塩水で溶解したこと、そして実施例7で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)を固相化して抗体価の測定を行うこと以外は実施例9と同様にして抗体の調製を行い、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質(a)に対するマウスポリクローナル抗体を得た。

なお、この得られた抗体の量はタンパク質量で1.1mgであった。

参考例2 実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の配列表の配列番号9で示されるペプチドへの反応性

実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号9で示されるペプチドへの反応性をELISA法で確かめた。

実施例9で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体に代えて、同濃度の実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いることと、実施例6で得た抗体産生用免疫原に代えて、同濃度の実施例7で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)をマイクロプレートに固相化すること以外は、参考例1と同様にして測定を行った。

この測定の結果を図12に示した。

この結果より、実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクロー

ーナル抗体が、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号9で示されるペプチドを特異的に認識して結合することが確かめられた。

参考例3 実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のリポタンパク質(a)及びLDLへの反応性

実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体それぞれのリポタンパク質(a)及びLDLへの反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

(1) リポタンパク質(a)濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジーンセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシアーエルケービー社製)にかけて精製リポタンパク質(a)を得た。

(2) LDL濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.006以上かつ1.063以下の部分を分取し、抗リポタンパク質(a)抗体(イムノ社製)をリガンドとして結合させたアフィニティークロマトグラフィーにかけて素通り画分を分取して、精製LDLを得た。

(3) これらのリポタンパク質(a)及びLDLを、それぞれ0.5mg/mlになるように生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)に溶解し、これらの2 $\mu$ lを試料としてタイタン・ジェル・リボ蛋白電気泳動キット(ヘレナ研究所社製)を用いて電気泳動を行った。なお、支持体はアガロースゲルであり、泳動緩衝液はバルビタール緩衝液(pH8.8)を使用して、電圧90Vで75分間通電して行った。

(4) 転写はノバ・プロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット(ファルマシアーエルケービー社製)を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。

(5) 転写用装置上に置いた(3)のアガロースゲルの上に、9cm $\times$ 9cm

のニトロセルロース膜（バイオラッド社製）を重ね、48 mM トリス、39 mM グリシン、0.0375% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、20% (V/V) メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流65 mAで2時間転写を行った。

(6) 転写を行ったニトロセルロース膜を、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59 mM リン酸水素二ナトリウム、1.47 mM リン酸二水素カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、2.68 mM 塩化カリウム (pH 7.2)）20 ml に4℃で1晩浸漬して、ブロッキングを行った。

(7) 次にこれを洗浄液（0.05% ツイーン20 (Tween 20) を含むリン酸緩衝生理食塩水）20 ml 中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

(8) 実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体それぞれを、20 ml のリン酸緩衝生理食塩水に80 µg ずつ溶解し、この2種類の溶液に(7)の操作を行ったニトロセルロース膜それぞれを室温で2時間浸漬して反応させた。

(9) なお対照として、実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体の代わりに、同濃度のヒツジ抗リポタンパク質 (a) 抗体（イムノ社製）と、LDLの構成成分のアポリポタンパク質B-100に対する同濃度のヤギ抗アポリポタンパク質B抗体（インターナショナルエンザイム社製）の混合物を用いて、前記(8)の操作を行った。

また、(7)で得られたニトロセルロース膜に、実施例9及び実施例10で得られたポリクローナル抗体、ヒツジ抗リポタンパク質 (a) 抗体並びにヤギ抗アポリポタンパク質B抗体のいずれも作用させないものを陰性対照として用意した。

(10) 前記(8)又は(9)の操作を行ったニトロセルロース膜を洗浄液20 ml で10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

(11) 次にパーオキシダーゼ標識抗マウス Ig G 抗体 (ダコ社製)、パーオキシダーゼ標識抗ヒツジ Ig G 抗体 (ダコ社製) 及びパーオキシダーゼ標識抗ヤギ Ig G 抗体 (ダコ社製) を 3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水で 500 倍希釈をして 20 ml の溶液を調製し、これにニトロセルロース膜を室温で 2 時間浸漬して反応させた。

(12) このニトロセルロース膜を洗浄液 20 ml で 10 分間振とう洗浄を行った。これを 3 回行った。

(13) 0.025% 3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び 0.01% 過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水 20 ml に室温で 15 分間 (12) のニトロセルロース膜を浸漬して発色させた。

このウエスタンブロット法の結果を図 13 に示した。

図 13 において、P は対照、N は陰性対照、そして 1、2 はそれぞれ実施例 9、実施例 10 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を作用させたものであって、おのおのの左側部分にリポタンパク質 (a) が、右側部分に LDL が転写されている。

これより、実施例 9 及び実施例 10 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体は、市販の抗リポタンパク質 (a) 抗体と同じ位置に発色を示し、かつ市販の抗アポリポタンパク質 B 抗体で発色を示す位置には発色を認めないことから、特異的にリポタンパク質 (a) と結合し、そして LDL とは結合しないことが確かめられた。

また、実施例 9 及び実施例 10 で得られた抗体、市販の抗リポタンパク質 (a) 抗体並びに市販の抗アポリポタンパク質 B 抗体を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

参考例 4 実施例 9 及び実施例 10 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体のプラスミノーゲンへの反応性

実施例 9 及び実施例 10 で得られたリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体それぞれのプラスミノーゲンへの反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

(1) プラスミノーゲン濃度が高いヒト血漿を、超遠心分離を行い比重が 1.21 以上の部分を分取し、リジーンセファロース 4B アフィニティークロマトグラフィー (ファルマシアーエルケービー社製) にかけて、更に抗リボタンパク質 (a) 抗体 (イムノ社製) をリガンドとして結合させたアフィニティークロマトグラフィーにかけて素通り画分を分取し、精製プラスミノーゲンを得た。

(2) 1.0 mg/ml になるように生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) で溶解したプラスミノーゲンの 10  $\mu$ l を試料として電気泳動を行った。なお、支持体は 3~12% SDS ポリアクリルアミドゲルで、泳動緩衝液は 0.1% SDS を含む 25 mM トリス-0.19 M グリシン緩衝液を使用して、電流 20 mA で 120 分間通電して行った。

(3) 転写はノバ・ブロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット (ファルマシアーエルケービー社製) を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。

(4) 転写用装置上に置いた (2) の 3~12% SDS ポリアクリルアミドゲルの上に、9 cm  $\times$  9 cm のニトロセルロース膜 (バイオラッド社製) を重ね、48 mM トリス、39 mM グリシン、0.0375% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、20% (V/V) メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流 65 mA で 2 時間転写を行った。

これ以降の操作は参考例 3 の (6) 以降の工程と同様にして行った。但し、参考例 3 の (9) では対照としてヒツジ抗リボタンパク質 (a) 抗体とヤギ抗アポリボタンパク質 B 抗体の混合物を用いているが、本参考例では同濃度のヤギ抗プラスミノーゲン抗体 (医学生物学研究所社製) を用いた。

このウエスタンブロット法の結果を図 14 に示した。

図14において、Pは対照、Nは陰性対照、そして1、2はそれぞれ実施例9、実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を作用させたものである。

これより、実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体は、市販の抗プラスミノゲン抗体で発色を示す位置に発色を認めないことから、プラスミノゲンとは結合しないことが確かめられた。

また、実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体等を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

実施例11 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリタンパク質(a)に対するマウスポリクローナル抗体の調製

実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がKLHのもの)を初回免疫時には $400\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように生理食塩水で溶解したと、追加免疫時には $200\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように生理食塩水で溶解したと、そして実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)を固相化して抗体価の測定を行うこと以外は実施例9と同様にして抗体の調製を行い、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリタンパク質(a)に対するマウスポリクローナル抗体を得た。

なお、この得られた抗体の量はタンパク質量で $1.0\text{mg}$ であった。

参考例5 実施例11で得られたアポリタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の配列表の配列番号10で示されるペプチドへの反応性

実施例11で得られたアポリタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体の、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号10で示されるペプチドへの反応性をELISA法で確かめた。

実施例9で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体に代えて、同濃度の実施例11で得られたアポリタンパク質(a)に対するポリクロ

ーナル抗体を用いることと、実施例6で得た抗体産生用免疫原に代えて、同濃度の実施例8で得た抗体産生用免疫原（担体がBSAのもの）をマイクロプレートに固相化すること以外は、参考例1と同様にして測定を行った。

この測定の結果を図15に示した。

この結果より、実施例11で得られたアポリポタンパク質（a）に対するポリクローナル抗体が、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号10で示されるペプチドを特異的に認識して結合することが確かめられた。

参考例6 実施例11で得られたアポリポタンパク質（a）に対するポリクローナル抗体のアポリポタンパク質（a）への反応性

実施例11で得られたアポリポタンパク質（a）に対するポリクローナル抗体のアポリポタンパク質（a）への反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

（1） リポタンパク質（a）濃度が高い4種類のヒト血清について、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジナーセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー（ファルマシアーエルケービー社製）にかけて4種類の精製リポタンパク質（a）を得た。

更に、この4種類の精製リポタンパク質（a）に1mMジチオスレイトールを加えて処理した後、再度超遠心分離を行い比重が1.21以上の部分を分取することにより低密度リポタンパク質（LDL）部分を除去し、精製アポリポタンパク質（a）を得た。

（2） この4種類の精製アポリポタンパク質（a）それぞれを0.5mg/mlになるように試料緩衝液（10mMトリス、1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）（pH6.80））に溶解し、この2 $\mu$ lを試料として4%SDSポリアクリルアミドゲル（テフコ社製）を用いてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。なお、陰極側緩衝液として40mMトリス、40mMホウ酸、

0. 1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) よりなる緩衝液 (pH 8. 64)、陽極側緩衝液として0. 43Mトリス緩衝液 (pH 9. 18) を用いて電流20 mAで75分間通電して行った。

(3) 転写はノバ・プロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット (ファルマシアーエルケービー社製) を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。

(4) 転写用装置上に置いた(2)の4% SDSポリアクリルアミドゲルの上に、9 cm×9 cmのニトロセルロース膜 (バイオラッド社製) を重ね、48 mMトリス、39 mMグリシン、0. 0375% (W/V) SDS、20% (V/V) メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流65 mAで2時間転写を行った。

(5) 転写を行ったニトロセルロース膜を、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水 (5. 59 mMリン酸水素二ナトリウム、1. 47 mMリン酸二水素カリウム、137 mM塩化ナトリウム、2. 68 mM塩化カリウム (pH 7. 2)) 20 mlに4℃で1晩浸漬して、ブロッキングを行った。

(6) 次にこれを洗浄液 (0. 05% ツイーン20 (Tween 20) を含むリン酸緩衝生理食塩水) 20 ml中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

(7) 実施例11で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を20 mlのリン酸緩衝生理食塩水に80 μg溶解し、この溶液に(6)の操作を行ったニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

(8) なお対照として、実施例11で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体の代わりに、同濃度のアポリポタンパク質 (a) と反応するヒツジ抗リポタンパク質 (a) 抗体 (イムノ社製) を用いて、前記(7)の操作を行った。また、(6)で得られたニトロセルロース膜に、実施例11で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体及びヒツジ抗リポ



タンパク質 (a) 抗体のいずれも作用させないものを陰性対照として用意した。

(9) 前記(7)又は(8)の操作を行ったニトロセルロース膜を洗浄液20 mlで10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

(10) 次にパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(ダコ社製)及びパーオキシダーゼ標識抗ヒツジIgG抗体(ダコ社製)を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で500倍希釈をして20mlの溶液を調製し、これにニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

(11) このニトロセルロース膜を洗浄液20mlで10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

(12) 0.025%3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01%過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水20mlに室温で15分間(11)のニトロセルロース膜を浸漬して発色させた。

(13) なお、本ウエスタンブロット法のバンドを確認する目安として、精製アポリポタンパク質B-100(自家調製)、ヤギ抗アポリポタンパク質B抗体(インターナショナルエンザイム社製)及びパーオキシダーゼ標識抗ヤギIgG抗体(ダコ社製)を用いて前記と同様の操作によりウエスタンブロット法を行い、アポリポタンパク質B-100のバンドを得た。

これらのウエスタンブロット法の結果を図16、図17及び図18に示した。

図16は、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を作用させたものである。

図16において、1ないし4は4種類のヒト血清由来の精製アポリポタンパク質(a)それぞれを泳動したものであり、Bは泳動位置の目安としてアポリポタンパク質B-100の位置を示すものである。

なお、このアポリポタンパク質B-100のバンドの位置との関係から[G. Utermann et al., J. Clin. Invest., 80, 458-465 (1987)]、1のバンドはアポリポタンパク質(a)のイソ

型のF型とB型を、2のバンドはS4型とF型を、3のバンドはS4型とS3型を、4のバンドはS4型とS2型をそれぞれ示すことがわかる。

図17は陰性対照のものであり、ここで1ないし4は4種類のヒト血清由来の精製アポリポタンパク質(a)それぞれを泳動させたものである。

図18は対照としてアポリポタンパク質(a)と反応する抗リポタンパク質(a)抗体を作用させたものであり、試料として前記の1のバンドの血清由来の精製アポリポタンパク質(a)を用いた。また、Bは目安としてアポリポタンパク質B-100の位置を示すものである。

図16及び図18によると、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体は、アポリポタンパク質(a)と反応する抗リポタンパク質(a)抗体と同じ位置に発色を示すことから、特異的にアポリポタンパク質(a)と結合することが確かめられた。

また、図16において、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体は、アポリポタンパク質(a)の種々のイソ型と反応することが確認された。

そして、図17において、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体及び抗リポタンパク質(a)抗体を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

参考例7 実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のリポタンパク質(a)への反応性

実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体のリポタンパク質(a)への反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

(1) リポタンパク質(a)濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジーンセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシアーエルケービー社製)にかけ

て精製リボタンパク質 (a) を得た。

(2) この精製リボタンパク質 (a) を  $0.5 \text{ mg/ml}$  になるように生理食塩水 ( $0.9\%$  塩化ナトリウム水溶液) に溶解し、この  $2 \mu\text{l}$  を試料としてタイタン・ジェル・リボ蛋白電気泳動キット (ヘレナ研究所社製) を用いて電気泳動を行った。なお、支持体はアガロースゲルであり、泳動緩衝液はバルビタール緩衝液 ( $\text{pH } 8.8$ ) を使用して、電圧  $90 \text{ V}$  で  $75$  分間通電して行った。

(3) 転写はノバ・ブロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット (ファルマシア・エルケービー社製) を用いて、その使用説明書に従い、ドライ方式で行った。

(4) 転写用装置上に置いた (2) のアガロースゲルの上に、 $9 \text{ cm} \times 9 \text{ cm}$  のニトロセルロース膜 (バイオラッド社製) を重ね、 $48 \text{ mM}$  トリス、 $39 \text{ mM}$  グリシン、 $0.0375\%$  ( $\text{W/V}$ ) SDS、 $20\%$  ( $\text{V/V}$ ) メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流  $65 \text{ mA}$  で  $2$  時間転写を行った。

これ以降の操作は、参考例 6 の (5) から (12) の工程と同様にして行った。

このウェスタンブロット法の結果を図 19 に示した。

図 19 において、P は対照、N は陰性対照、そして S は実施例 11 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を作用させたものである。

図 19 における対照及び陰性対照との比較より、実施例 11 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体は、リボタンパク質 (a) とは反応しないことが確かめられた。

参考例 8 実施例 11 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体のプラスミノゲンへの反応性

実施例 11 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体のプラスミノゲンへの反応性をウェスタンブロット法により確かめた。

実施例 9 及び実施例 10 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体に代えて、実施例 11 で得られたアポリリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を用いること以外は、参考例 4 と同様にして操作を行った。

この結果、実施例 11 で得られたアポリリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体は、市販の抗プラスミノゲン抗体で発色を示す位置に発色を認めないことから、プラスミノゲンとは結合しないことが確かめられた。

また、実施例 11 で得られたアポリリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体等を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

実施例 12 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリポタンパク質 (a) に対するウサギポリクローナル抗体の調製

実施例 6 で得た抗体産生用免疫原 (担体が K L H のもの) を  $1.6 \text{ mg/ml}$  になるように生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その  $1 \text{ ml}$  を 3 カ月齢のウサギ (日本白色種) の背部皮下に 20 箇所以上免疫注射を行った。

初回免疫から 2 週間後に、前記の抗体産生用免疫原を  $0.8 \text{ mg/ml}$  になるように生理食塩水で溶解し、フロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その  $1 \text{ ml}$  により追加免疫注射を行った。この追加免疫注射は 2 週間おきに行った。

免疫動物であるこのウサギの血清中の抗体価を、酵素免疫測定法 (E L I S A、E I A) にて 1 週間ごとに測定した。この E L I S A 法は、実施例 6 で得た抗体産生用免疫原 (担体が B S A のもの) をマイクロプレートに固相化し、これに免疫動物の血清を加えて反応させ、洗浄後更にパーオキシダーゼ (P O D) 標識抗ウサギ I g G 抗体を加えて反応を行わせ、そして洗浄した後、過酸化水素と 2, 2' - アジノービス (3 - エチルベンズチアゾリン - 6 - スルホン酸)

〔A B T S〕を含んだ発色液を加えて発色させて、E I Aプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415nmの吸光度を測定して抗体価を求めるという操作法により行った。

追加免疫注射を5回行った後に、抗体価がプラトーに達したと認められたので、全採血を行い血清を分離して82mlの抗血清を得た。

この抗血清を10,000r.p.m.で30分間遠心分離を行い不溶物を除去した後、温度20℃で抗血清1ml当たり0.18gの硫酸ナトリウムにより塩析を行った。ここで得られた免疫グロブリンの沈澱画分をできるだけ少量の17.5mMリン酸二水素ナトリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液（pH 6.3）に溶解した後、この17.5mMリン酸二水素ナトリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液（pH 6.3）により十分に透析を行った。

透析後、17.5mMリン酸二水素ナトリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液（pH 6.3）で平衡化しておいたD E A E－セルロースイオン交換カラム（セルバ社製）に通し素通り画分を分取することにより、配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質（a）に対するウサギポリクローナル抗体を得た。

なお、この得られた抗体の量はタンパク質量で0.74gであった。

実施例13 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質（a）に対するウサギポリクローナル抗体の調製

実施例7で得た抗体産生用免疫原（担体がK L Hのもの）を初回免疫時には2.2mg/mlになるように生理食塩水で溶解したことと、追加免疫時には1.1mg/mlになるように生理食塩水で溶解したこと、そして実施例7で得た抗体産生用免疫原（担体がB S Aのもの）を固相化して抗体価の測定を行うこと以外は実施例12と同様にして抗体の調製を行い、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質（a）に対するウサギポリクローナル抗体を得た。

なお、この得られた抗体の量はタンパク質量で0.78gであった。

実施例14 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリタンパク質(a)に対するウサギポリクローナル抗体の調製

実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がKLHのもの)を初回免疫時には1.7mg/mlになるように生理食塩水で溶解したこと、追加免疫時には0.9mg/mlになるように生理食塩水で溶解したこと、そして実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)を固相化して抗体価の測定を行うこと以外は実施例12と同様にして抗体の調製を行い、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリタンパク質(a)に対するウサギポリクローナル抗体を得た。

なお、この得られた抗体の量はタンパク質量で0.71gであった。

実施例15 免疫比濁法によるリポタンパク質(a)測定法

実施例9で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いて免疫比濁法によるリポタンパク質(a)測定系を確立した。

(1) 測定に用いた試薬は、試薬1として300mM塩化ナトリウム、5%(W/W)ポリエチレングリコール6000を含む40mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)、試薬2として6mg/mlの実施例9で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム(pH7.2))、をそれぞれ調製した。

(2) 試料は、リポタンパク質(a)濃度が77.0mg/dlの血清を生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)で3段階に希釈して、リポタンパク質(a)濃度が25.7mg/dl、51.3mg/dl、77.0mg/dlの3種類の試料を用意した。

(3) 測定は、エフ・ホフマン・ラ・ロシュ社(F. Hoffmann.

La. Roche) のコーバス・ミラ (COBAS MIRA) 自動分析装置を使用して、 $3\mu\text{l}$  の試料と  $300\mu\text{l}$  の試薬 1 を混合して  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加温後、 $20\mu\text{l}$  の試薬 2 を添加混合して  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間反応させた後、 $340\text{nm}$  における吸光度の測定を行った。

3 種類の試料を測定して得た検量線を図 20 に示した。

これより、本測定法においては検量線が原点を通る直線であることがわかり、本発明のリポタンパク質 (a) 測定法によりリポタンパク質 (a) を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例 16 免疫比濁法によるリポタンパク質 (a) 測定法

実施例 10 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を用いて免疫比濁法によるリポタンパク質 (a) 測定系を確立した。

実施例 15 (1) の試薬 2 の成分として実施例 9 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体に代えて、同濃度の実施例 10 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を用いること以外は、実施例 15 と同様にして測定を行った。

3 種類の試料を測定して得た検量線を図 21 に示した。

これより、本測定法においては検量線が原点を通る直線であることがわかり、本発明のリポタンパク質 (a) 測定法によりリポタンパク質 (a) を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例 17 ELISA 法によるリポタンパク質 (a) 測定法

実施例 9 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を用いて ELISA 法によるリポタンパク質 (a) 測定系を確立した。

(1)  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  の抗リポタンパク質 (a) 抗体 (インターナショナルエンザイム社製) を 96 ウェルマイクロプレート (ヌンク社製) に 1 ウェル当り  $100\mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間静置して抗リポタンパク質 (a) 抗体の固相化を行った (固相化抗体)。

(2) このマイクロプレートを洗浄液 (0.05% ツイーン 20 (Tween 20) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (5.59 mM リン酸水素二ナトリウム、1.47 mM リン酸二水素カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、2.68 mM 塩化カリウム (pH 7.2))) で洗浄した後、1% BSA を含む 10 mM リン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.2) を 1 ウェル当たり 300  $\mu$ l ずつ加えて、37°C で 2 時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

(3) リポタンパク質 (a) 濃度が 100 mg/dl の血清を生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) で 5 段階に希釈して、リポタンパク質 (a) 濃度が 20 mg/dl、40 mg/dl、60 mg/dl、80 mg/dl、100 mg/dl の 5 種類の試料を用意した。

(4) 前記の 5 種類の試料を生理食塩水で 500 倍に希釈した後、(2) で調製したマイクロプレートに 1 ウェル当たり 100  $\mu$ l ずつ分注し、37°C で 2 時間静置して抗原抗体反応を行わせた。

(5) これを洗浄液で洗浄した後、50  $\mu$ g/ml になるように 3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水で溶解した実施例 9 で得られたリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を、1 ウェル当たり 100  $\mu$ l ずつ加え、37°C で 2 時間静置して反応を行わせ (一次抗体)、その後洗浄液で洗浄した。

(6) パーオキシダーゼ (POD) 標識抗マウス IgG 抗体 (アマシャム社製) を 3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水で 2,000 倍に希釈した後、(5) のマイクロプレートに 1 ウェル当たり 100  $\mu$ l ずつ加え、37°C で 2 時間静置して反応を行わせた (二次抗体)。

(7) これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液 (3 mM オーフエニレンジアミンを含む 50 mM リン酸水素二ナトリウム-24 mM クエン酸緩衝液の 1 ml に対して 2  $\mu$ l の 1.7% 過酸化水素を使用直前に添加したもの) を 1 ウェル当たり 100  $\mu$ l ずつ加え、室温で反応させた。15 分後に 1 ウェル当



り50 $\mu$ lの6N硫酸を加えて反応を停止させた。

(8) これをEIAマイクロプレートリーダー(バイオラッド社製)にて492nmにおける吸光度の測定を行った。

5種類の試料を測定して得た検量線を図22に示した。

これより、本発明のリボタンパク質(a)測定法によりリボタンパク質(a)を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例18 ELISA法によるリボタンパク質(a)測定法

実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いてELISA法によるリボタンパク質(a)測定系を確立した。

実施例17(5)の実施例9で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体に代えて、同濃度の実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いること以外は、実施例17と同様にして測定を行った。

5種類の試料を測定して得た検量線を図23に示した。

これより、本発明のリボタンパク質(a)測定法によりリボタンパク質(a)を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例19 リボタンパク質(a)測定値の比較

本発明の実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いたリボタンパク質(a)測定法(ELISA法)と、A社製リボタンパク質(a)測定試薬(ELISA法)及びB社製リボタンパク質(a)測定試薬(免疫比濁法)とで測定値の比較を行った。

3種類の血清よりなる試料1、試料2、そして試料3について、本発明の実施例10で得られたリボタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いたリボタンパク質(a)測定法(ELISA法)により測定を行った。なお、ELISA法の操作は実施例17と同様にして行った。

また、A社製リボタンパク質(a)測定試薬及びB社製リボタンパク質(a)

測定試薬による3種類の試料の測定の操作は、使用説明書に従って行った。

これらの測定の結果を表4にまとめた。

表 4

	本発明測定法	A社製試薬	B社製試薬
試料1	58.0	51.3	54.0
試料2	0.0	0.0	5.0以下
試料3	42.0	42.0	44.9

(単位はmg/dl)

これより、本発明のリポタンパク質(a)測定法によるリポタンパク質(a)測定値が、既存の測定法による測定値と同じ値を示すことがわかり、本発明のリポタンパク質(a)測定法は臨床検査の実用上問題がないことが確かめられた。

参考例9 本発明のリポタンパク質(a)測定法に対するプラスミノーゲンの影響

本発明のリポタンパク質(a)測定法に対するプラスミノーゲンの影響を見るため、4種類の一次抗体(A-1、A-2、B、C)を用意して以下の検討を行った。

(1) 固相化抗体として、ヤギ抗プラスミノーゲン抗体(医学生物学研究所社製)をマイクロプレートに固相化したものを用意した。

(2) 一次抗体として、A-1では実施例9で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体、A-2では実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体、Bではプラスミノーゲンとは結合するがリポタンパク質(a)とは結合しないマウスモノクローナル抗体(プラスミノーゲンのクリングル1、クリングル2及びクリングル3部分に特異的に結合する抗体)〔自家製〕、Cではリポタンパク質(a)を免疫原として得たマウスポリクローナル抗体でプラスミノーゲンによる吸収操作を行っていないもの(自家

製)、の4種類の抗体を用意した。

(3) 二次抗体として、パーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(アマシャム社製)を用意した。

(4) 試料としては、44mg/dl、88mg/dl、132mg/dl、176mg/dl、220mg/dlの5種類の精製プラスミノーゲン(自家製)試料を調製し、測定時にそれぞれを生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)で3,000倍希釈して測定に使用した。

(5) 前記の5種類の試料を、前記(1)の固相化抗体、(2)の4種類の一次抗体、そして(3)の二次抗体を用いてELISA法により測定を行った。なお、測定の操作は実施例17と同様にして行った。

5種類のプラスミノーゲン試料を測定して得た結果を図24に示した。

これより、一次抗体として、プラスミノーゲンとのみ結合する抗体(B)を用いた測定系、及びリポタンパク質(a)を免疫原として得た抗体(C)を用いた測定系ではプラスミノーゲンを測りこんでしまっていることがわかる。

これに対して、一次抗体として実施例9又は実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体(A-1、A-2)を用いた本発明のリポタンパク質(a)測定系は、プラスミノーゲンを全く測りこまないことがわかる。

よって本発明のリポタンパク質(a)測定法は、試料中のプラスミノーゲンの影響を受けずに、リポタンパク質(a)の濃度を正しく定量することができる方法であることが確かめられた。

#### 実施例20 ELISA法によるアポリポタンパク質(a)測定法

実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体を用いてELISA法によるアポリポタンパク質(a)測定系を確立した。

(1) アポリポタンパク質(a)とも反応する抗リポタンパク質(a)抗体(インターナショナルエンザイム社製)にペプシン処理を施しF(ab')<sub>2</sub>とした

後、 $15\mu\text{g}/\text{ml}$ のこの抗体フラグメントを96ウェルマイクロプレート（ヌンク社製）に1ウェル当り $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置して抗リポタンパク質（a）抗体フラグメントの固相化を行った（固相化抗体）。

（2） このマイクロプレートを洗浄液（0.05%ツイーン20（Tween 20）を含むリン酸緩衝生理食塩水（5.59mMリン酸水素二ナトリウム、1.47mMリン酸二水素カリウム、137mM塩化ナトリウム、2.68mM塩化カリウム（pH7.2）））で洗浄した後、1%BSAを含む10mMリン酸二水素カリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液（pH7.2）を1ウェル当り $300\mu\text{l}$ ずつ加えて、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

（3） リポタンパク質（a）濃度が高いヒト血清について、超遠心分離を行い比重が1.05以上かつ1.12以下の部分を分取し、更にリジノーセファロース4Bアフィニティークロマトグラフィー（ファルマシア－エルケービー社製）にかけて精製リポタンパク質（a）を得た。

更に、この精製リポタンパク質（a）に1mMジチオスレイトールを加えて処理した後、再度超遠心分離を行い比重が1.21以上の部分を分取することによりLDL部分を除去し、これを精製アポリポタンパク質（a）とした。

この精製アポリポタンパク質（a）を生理食塩水（0.9%塩化ナトリウム水溶液）で希釈して $40\text{mg}/\text{dl}$ とした後、生理食塩水で4段階に希釈して、アポリポタンパク質（a）濃度が $10\text{mg}/\text{dl}$ 、 $20\text{mg}/\text{dl}$ 、 $30\text{mg}/\text{dl}$ 、 $40\text{mg}/\text{dl}$ の4種類の試料を用意した。

（4） 前記の4種類の試料を試料希釈液（10mMトリス、0.9%塩化ナトリウム、1%BSA（pH8.0））で100倍に希釈した後、（2）で調製したマイクロプレートに1ウェル当り $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 $37^\circ\text{C}$ で2時間静置して抗原抗体反応を行わせた。

（5） これを洗浄液で洗浄した後、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように3%BSAを

含むリン酸緩衝生理食塩水で溶解した実施例 11 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を、1 ウェル当り  $100\mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^{\circ}\text{C}$  で 2 時間静置して反応を行わせ (一次抗体)、その後洗浄液で洗浄した。

以下の操作は、実施例 17 の (6) から (8) の工程と同様にして、測定を行った。

4 種類の試料を測定して得た検量線を図 25 に示した。

これより、本発明のアポリボタンパク質 (a) 測定法によりアポリボタンパク質 (a) を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例 21 アポリボタンパク質 (a) 測定法における血清試料の影響

実施例 11 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体を用いたアポリボタンパク質 (a) 測定法 (ELISA 法) において、血清試料の影響を受けないことを添加回収試験により確認した。

(1) 3 種類の血清 (A, B, C) を用意し、これをベースに以下の試料を調製した。

① 3 種類の血清 (A, B, C)  $0.9\text{ml}$  に対して生理食塩水 ( $0.9\%$  塩化ナトリウム水溶液)  $0.1\text{ml}$  をそれぞれ添加混合した 3 種類の試料。

② 3 種類の血清 (A, B, C)  $0.9\text{ml}$  に対して、生理食塩水で  $100\text{mg}/\text{dl}$  とした実施例 20 で得た精製アポリボタンパク質 (a)  $0.1\text{ml}$  をそれぞれ添加混合することにより、①で調製した 3 種類の血清試料のアポリボタンパク質 (a) 濃度を  $10\text{mg}/\text{dl}$  増加させた 3 種類の試料。

③ 実施例 20 で得た精製アポリボタンパク質 (a) を生理食塩水で希釈して  $10\text{mg}/\text{dl}$  とした試料。

(2) 前記の 7 種類の試料について、実施例 20 の ELISA 法によるアポリボタンパク質 (a) 測定法により測定を行い、それぞれの試料の吸光度値を求めた。この結果を表 5 にまとめた。

表 5

	血清 A	血清 B	血清 C
① 血清と生理食塩水を混合した試料の吸光度	0.047	0.060	0.011
③ 10mg/dl の精製アポリポタンパク質 (a) の吸光度	0.110	0.110	0.110
④ ①の血清試料のアポリポタンパク質 (a) 濃度を10mg/dl 増加させた時の理論上の吸光度 (①+③)	0.157	0.170	0.121
② ①の血清試料のアポリポタンパク質 (a) 濃度を10mg/dl 増加させた時の測定で得た吸光度	0.165	0.167	0.132
⑤ 吸光度の測定値の理論値に対する比率 (②/④)	105%	98.2%	109%

これより、本発明のアポリポタンパク質 (a) 測定法では、血清試料の測定でもほぼ理論値どおりの測定値が得られることが判明した。

よって、本発明のアポリポタンパク質 (a) 測定法は、血清試料による非特異的反応等の影響を受けずに、血清試料中のアポリポタンパク質 (a) を正確に測定できる方法であることがわかり、臨床検査の実用上問題がないことが確かめられた。

実施例 22 配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリポタンパク質 (a) に対するマウスモノクローナル抗体の調製

#### 〔1〕動物への免疫

(1) 実施例 7 で得た抗体産生用免疫原 (担体が KLH のもの) を  $500 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) で溶解し、これをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、8 週齢のメスの BALB/c マウス (日本チャールズリバー社) の腹部皮下に 0.5

m l を免疫注射した。

(2) 初回免疫から2週間後に、前記の抗体産生用免疫原を  $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように生理食塩水で溶解し、フロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その  $0.5 \text{ ml}$  により追加免疫注射を行った。

この追加免疫注射は2週間おきに行った。

(3) 免疫動物であるこのマウスの血清中の抗体価を、酵素免疫測定法 (ELISA、EIA) にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。このELISA法は、実施例7で得た抗体産生用免疫原 (担体がBSAのもの) をマイクロプレートに固相化し、これに免疫動物の血清を加えて反応させ、洗浄後更にパーオキシダーゼ (POD) 標識抗マウスIgG抗体を加えて反応を行わせ、そして洗浄した後、過酸化水素と2, 2'-アジノービス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) [ABTS] を含んだ発色液を加えて発色させて、EIAプレートリーダー (バイオラッド社製) にて  $415 \text{ nm}$  の吸光度を測定して抗体価を求めるという操作法により行った。

(4) 初回免疫から16週間目以降、抗体価がプラトーに達したと認められたので、この免疫動物であるマウスの腹部皮下に、生理食塩水で  $800 \mu\text{g}/\text{ml}$  とした実施例7で得た抗体産生用免疫原 (担体がKLHのもの) の  $0.5 \text{ ml}$  を注射した。

その後3日目に、この免疫動物のマウスより脾臓を取得した。

## [2] 骨髓腫細胞の増殖

BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ欠損の骨髓腫細胞株であるP3-X63-Ag8-U1株 (癌研究リサーチソースバンク 9085) を、胎生ウシ血清を10%含有しグルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンを補ったRPMI 1640組織培養培地 (バイオセル社製) で増殖を行った。

これは、この骨髓腫細胞を細胞培養用中型ボトル (ヌンク社製、 $200 \text{ ml}$

容) 内で、ボトルの底面の約8割を細胞が占めるまで増殖させた。なお、細胞数は、トリパン青染料排除法及び血球計で計数を行った。

### 〔3〕細胞融合

(1) 前記の免疫動物のマウスから取得した脾臓を、ステンレススチールメッシュ#200を使用して十分にほぐし、血清を含まないRPMI 1640培地液で洗浄しながら濾過した。

その後、200gで遠心分離を行い、脾臓細胞を分離した。

更に、再度血清を含まないRPMI 1640培地液で3回脾臓細胞を洗浄した。

(2) この脾臓細胞と前記の増殖させたP3-X63-Ag8-U1株骨髓腫細胞を5対1の割合で混合した後、遠心分離を行った。

混合した細胞を、ポリエチレングリコール1500 (PEG1500、ベーリンガーマンハイム社製) を50%含むRPMI 1640培地液にゆっくりと懸濁した。

そして、最終的にポリエチレングリコール濃度が5%となるように、これをRPMI 1640培地液で徐々に希釈した。

(3) これより細胞を遠心分離で分離し、5%のハイブリドーマクローニングファクター (オリゲン社製) を含んだS-クローン培地 (三光純薬社) よりなる増殖培地に徐々に分散させた。

そして、平底の96穴マイクロタイタープレート (ヌンク社製) のウェルに、1ウェル当たり $10^6$  個/ $100\mu\text{l}$ の細胞数の細胞を植え、5%の二酸化炭素中 $37^\circ\text{C}$ で培養した。

(4) 細胞融合後1日目に、各ウェルに $100\mu\text{l}$ のHAT培地 (前記の増殖培地に0.01mMヒポキサンチン、 $1.6\mu\text{M}$ チミジン及び $0.04\mu\text{M}$ アミノプテリンとなるようにそれぞれを補充したもの、いずれも東京化成社製) を加えた。



その後3日間は、毎日、約半分のHAT培地を新しいHAT培地と交換し、更にその後は、2～3日毎に同様の交換を行った。

(5) 細胞は、顕微鏡で観察を行った。

ハイブリドーマ（融合細胞）のクローンは10日以後より出現し、14日以降に配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を認識する抗体の産生を検査するため、ウェルの上澄み液をELISA法でスクリーニングした。なお、このELISA法の操作は、参考例2と同様にして行った。

(6) 抗体産生検査陽性のウェルは、24穴のウェルがあるプレートに抜けて培養し、細胞密度が高くなるに従い、小型ボトル、中型ボトルとスケールを大きくして培養した。

(7) そして、ハイブリドーマはHT培地（アミノプテリン及びハイブリドーマクローニングファクターを含まないHAT培地）で培養、保持した。

(8) 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を認識する抗体の産生をELISA法により参考例2と同様にして調べたところ、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである実施例7で得た抗体産生用免疫原（担体がBSAのもの）と結合し、BSAとは結合しない抗体を産生する4個のハイブリドーマを確認した。

#### 〔4〕ハイブリドーマサブクローニング

(1) 前記の4個のハイブリドーマを、限界希釈法にてサブクローニングした。

これらのハイブリドーマの細胞数を、トリパン青染料排除法及び血球計により計数を行った。

そして、これらのハイブリドーマを、100 $\mu$ lのHT培地当たり、0.5個の生育細胞数の割合と1個の生育細胞数の割合の2種類の割合で懸濁し、96穴の平底マイクロプレートの1ウェル当たり100 $\mu$ lずつ分注した。

これを、2～3日毎に培地を交換して、ハイブリドーマを増殖させた。

(2) 2週間後、顕微鏡下で各ウエルのコロニー数を調べ、そして配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである実施例7で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)と結合し、BSAとは結合しない抗体を産生するウエルを前記と同様にしてELISA法で調べた。

1ウエル中に1コロニーが存在し、そしてこのような抗体を産生するウエルを4個得た。

(3) これを、24穴のプレートに移し、細胞生育が良好となるまで2週間培養を行った。

(4) 次に、これらのハイブリドーマが産生する抗体のリポタンパク質(a)との反応性をウエスタンブロット法で調べた。

操作は、LDLへの反応性は確かめないことと、実施例9及び実施例10で得られたリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体に代えてハイブリドーマの培養上清を用いる他は、参考例3と同様にして行った。

この結果、1個のハイブリドーマが、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリポタンパク質(a)に対する抗体を産生する細胞株であることが判明した。

(5) このハイブリドーマを、再度前記(1)及び(2)と同様にしてクローニングを行い、それぞれのウエルについて抗体の産生を調べたところ、1ウエル中に1コロニーのハイブリドーマが存在し、そして配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである実施例7で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)と結合し、BSAとは結合しない抗体を産生するものを全部で40クローン得た。

(6) これらのハイブリドーマのクローンが産生する抗体のリポタンパク質(a)との反応性を、再度前記(4)と同様にしてウエスタンブロット法で調べた。

これより、これら全てのハイブリドーマのクローンが、配列表の配列番号2で

示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対する抗体を産生する細胞であることが確かめられた。

(7) これを本発明の配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株 [243G7E7F10株] とした。

このハイブリドーマ細胞株 [243G7E7F10株] は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM BP-4379 として平成 5 年 8 月 4 日付けにて寄託されている。

#### [5] モノクローナル抗体の産生

(1) 得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体産生細胞株を、中型ボトル (ヌンク社製) の中で、底面の約 8 割を細胞が占めるまで HT 培地中で培養を行った。

(2) その後、これらのハイブリドーマを掻き取り、そして 200 g、5 分間の遠心分離を行い集めた。

次に、これを血清を含まない RPMI 1640 培地液で 3 回洗浄した後、2 ml の RPMI 1640 培地液に懸濁した。

(3) 前もって 2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカンで処置しておいたオスの BALB/c マウス (日本チャールズリバー社) の腹腔に、前記 (2) で得たハイブリドーマ懸濁液 1 ml を注射した。

注射から 2 週間以内に腹部の膨張が認められなかった場合には、再度これを繰り返し行った。

(4) このマウスの腹部の膨張が認められたときに腹水を採取した。

これを 200 g、5 分間の遠心分離にかけ、リボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を含む上澄み液をハイブリドーマから分離して取得した。

#### [6] モノクローナル抗体の精製

(1) リボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を含む上澄み液の

10 ml に、22℃で硫酸ナトリウム 1.8 g を攪拌しながら加え、硫酸ナトリウムが完全に溶けてから更に1時間攪拌を続けて塩析を行った。

(2) これを22℃で遠心分離(7000 g, 15分間)を行い、上澄み液と分離して得た沈澱を、30 mM塩化ナトリウムを含む40 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0) 2 ml に溶解した。

(3) 次に、これを30 mM塩化ナトリウムを含む40 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0) に対して十分に透析した後、1000 g で20分間遠心分離し不溶性のものを除去した。

(4) これを30 mM塩化ナトリウムを含む40 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0) で平衡化しておいたDEAE-セルロースイオン交換カラム(セルバ社製) [1×10 cm] に流速0.4 ml/分を通して、溶出液を2 ml ずつ集めた。

(5) 免疫グロブリンG(IgG) が溶出液の素通り画分に含まれていることを280 nmの吸光度より確認し、これを集めて2 ml に濃縮した。

(6) 更に、これをプロテインA-セファロースCL-4Bアフィニティークロマトグラフィー(ファルマシア-エルケービー社製)にかけて精製を行い、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するリボタンパク質(a) に対するマウスモノクローナル抗体を得た。

なお、この得られたモノクローナル抗体の量はタンパク質量で15 mgであった。

また、ここで得たリボタンパク質(a) に対するモノクローナル抗体の抗体クラスとサブタイプは、市販の特異抗マウス免疫グロブリン抗血清(ダコ社製)を用いたオクタロニイ免疫拡散法によりIgG<sub>1</sub>、λ鎖と決定した。

参考例10 実施例22で得られたリボタンパク質(a) に対するモノクローナル抗体の配列表の配列番号8、配列番号9及び配列番号10で示されるペプチドへの反応性

実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体の、配列表の配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含むペプチドである配列表の配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 10 で示されるペプチドへの反応性を ELISA 法で確かめた。

(1) 実施例 6 で得られた抗体産生用免疫原 (担体が BSA のもの)、実施例 7 で得られた抗体産生用免疫原 (担体が BSA のもの) 及び実施例 8 で得られた抗体産生用免疫原 (担体が BSA のもの) それぞれを  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  になるように生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) に溶解し、これらを 96 ウェルマイクロプレート (ヌンク社製) に 1 ウェル当り  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間静置してペプチドの固相化を行った。

(2) このマイクロプレートを洗浄液 (0.05% ツイーン 20 (Tween 20) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (5.59 mM リン酸水素二ナトリウム、1.47 mM リン酸二水素カリウム、137 mM 塩化ナトリウム、2.68 mM 塩化カリウム (pH 7.2))) で洗浄した後、1% BSA を含む 10 mM リン酸二水素カリウム-リン酸水素二カリウム緩衝液 (pH 7.2) を 1 ウェル当り  $300 \mu\text{l}$  ずつ加えて、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間静置してブロッキングを行い、その後再び洗浄液で洗浄した。

(3) 実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を 3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水で希釈して、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  及び  $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$  の 4 種類の抗体濃度の試料を調製した。このそれぞれを 1 ウェル当り  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。

(4) また対照として、3% BSA を含むリン酸緩衝生理食塩水を (2) のマイクロプレートに 1 ウェル当り  $100 \mu\text{l}$  ずつ加え、 $37^\circ\text{C}$  で 2 時間静置して反応を行わせ、その後洗浄液で洗浄した。

(5) パーオキシダーゼ (POD) 標識抗マウス IgG 抗体 (アマシャム社

製)を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で2,000倍に希釈した後、  
(3)及び(4)のマイクロプレートに1ウエル当り100 $\mu$ lずつ加え、37  
℃で2時間静置して反応を行わせた。

(6) これを洗浄液で洗浄した後、パーオキシダーゼ反応液(3mM o-フ  
ェニレンジアミンを含む50mMリン酸水素二ナトリウム-24mMクエン酸緩  
衝液の1mlに対して2 $\mu$ lの1.7%過酸化水素を使用直前に添加したもの)  
を1ウエル当り100 $\mu$ lずつ加え、室温で反応させた。15分後に1ウエル当  
り50 $\mu$ lの6N硫酸を加えて反応を停止させた。

(7) これをEIAプレートリーダー(バイオラッド社製)にて492nmに  
おける吸光度の測定を行った。

この測定の結果を図26に示した。なおここでは、各試料の吸光度から対照の  
吸光度を引いたものを図に示した。

図26において、1、2及び3はそれぞれ実施例6で得られた抗体産生用免疫  
原、実施例7で得られた抗体産生用免疫原及び実施例8で得られた抗体産生用免  
疫原に対しての測定値(吸光度)を示す。

この結果より、実施例22で得られたリボタンパク質(a)に対するモノクロ  
ーナル抗体は、配列表の配列番号1及び配列番号3で示されるアミノ酸配列をそ  
れぞれ含むペプチドである配列表の配列番号8及び配列番号10で示されるペプ  
チドとは結合せず、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列を含むペプチド  
である配列表の配列番号9で示されるペプチドを特異的に認識して結合すること  
が確かめられた。

実施例23 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識す  
るアポリタンパク質(a)に対するマウスモノクローナル抗体の調製

#### [1] 動物への免疫

(1) 実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がKLHのもの)を400 $\mu$ g  
/mlになるように生理食塩水(0.9%塩化ナトリウム水溶液)で溶解し、こ

れをフロイント完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、8週齢のメスのBALB/cマウス（日本チャールズリバー社）の腹部皮下に0.5 mlを免疫注射した。

(2) 初回免疫から2週間後に、前記の抗体産生用免疫原を200  $\mu$ g/mlになるように生理食塩水で溶解し、フロイント不完全アジュバントと等量ずつ混合してエマルジョンとして、その0.5 mlにより追加免疫注射を行った。

この追加免疫注射は2週間おきに行った。

(3) 免疫動物であるこのマウスの血清中の抗体価を、酵素免疫測定法(ELISA、EIA)にて、初回免疫から6週間目より1週間ごとに測定した。このELISA法は、実施例8で得た抗体産生用免疫原（担体がBSAのもの）をマイクロプレートに固相化し、これに免疫動物の血清を加えて反応させ、洗浄後更にパーオキシダーゼ(POD)標識抗マウスIgG抗体を加えて反応を行わせ、そして洗浄した後、過酸化水素と2, 2'-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)[ABTS]を含んだ発色液を加えて発色させて、EIAプレートリーダー（バイオラッド社製）にて415 nmの吸光度を測定して抗体価を求めるという操作法により行った。

(4) 初回免疫から18週間目以降、抗体価がプラトーに達したと認められたので、この免疫動物であるマウスの腹部皮下に、生理食塩水で800  $\mu$ g/mlとした実施例8で得た抗体産生用免疫原（担体がKLHのもの）の0.5 mlを注射した。

その後3日目に、この免疫動物のマウスより脾臓を取得した。

## [2] 骨髓腫細胞の増殖

BALB/cマウス由来のヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル・トランスフェラーゼ欠損の骨髓腫細胞株であるP3-X63-Ag8-U1株（癌研究リサーチソースバンク 9085）を、胎生ウシ血清を10%含有しグルタミン、ペニシリン及びストレプトマイシンを補ったRPMI 1640組織培養培地

(バイオセル社製)で増殖を行った。

これは、この骨髓腫細胞を細胞培養用中型ボトル(ヌンク社製、200ml容)内で、ボトルの底面の約8割を細胞が占めるまで増殖させた。なお、細胞数は、トリパン青染料排除法及び血球計で計数を行った。

### [3] 細胞融合

(1) 前記の免疫動物のマウスから取得した脾臓を、ステンレススチールメッシュ#200を使用して充分にほぐし、血清を含まないRPMI 1640培地液で洗浄しながら濾過した。

その後、200gで遠心分離を行い、脾臓細胞を分離した。

更に、再度血清を含まないRPMI 1640培地液で3回脾臓細胞を洗浄した。

(2) この脾臓細胞と前記の増殖させたP3-X63-Ag8-U1株骨髓腫細胞を5対1の割合で混合した後、遠心分離を行った。

混合した細胞を、ポリエチレングリコール1500(PEG1500、ベリンガーマンハイム社製)を50%含むRPMI 1640培地液にゆっくりと懸濁した。

そして、最終的にポリエチレングリコール濃度が5%となるように、これをRPMI 1640培地液で徐々に希釈した。

(3) これより細胞を遠心分離で分離し、5%のハイブリドーマクローニングファクター(オリゲン社製)を含んだS-クローン培地(三光純薬社)よりなる増殖培地に徐々に分散させた。

そして、平底の96穴マイクロタイタープレート(ヌンク社製)のウエルに、1ウエル当たり $10^6$ 個/ $100\mu\text{l}$ の細胞数の細胞を植え、5%の二酸化炭素中 $37^\circ\text{C}$ で培養した。

(4) 細胞融合後1日目に、各ウエルに $100\mu\text{l}$ のHAT培地(前記の増殖培地に $0.01\text{mM}$ ヒポキサンチン、 $1.6\mu\text{M}$ チミジン及び $0.04\mu\text{M}$ アミ



ノプテリンとなるようにそれぞれを補充したもの、いずれも東京化成社製）を加えた。

その後3日間は、毎日、約半分のHAT培地を新しいHAT培地と交換し、更にその後は、2～3日毎に同様の交換を行った。

(5) 細胞は、顕微鏡で観察を行った。

ハイブリドーマ（融合細胞）のクローンは10日以後より出現し、14日以降に配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を認識する抗体の産生を検査するため、ウェルの上澄み液をELISA法でスクリーニングした。なお、このELISA法の操作は、参考例5と同様にして行った。

(6) 抗体産生検査陽性のウェルは、24穴のウェルがあるプレートに拵げて培養し、細胞密度が高くなるに従い、小型ボトル、中型ボトルとスケールを大きくして培養した。

(7) そして、ハイブリドーマはHT培地（アミノプテリン及びハイブリドーマクローニングファクターを含まないHAT培地）で培養、保持した。

(8) 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を認識する抗体の産生をELISA法により参考例5と同様にして調べたところ、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである実施例8で得た抗体産生用免疫原（担体がBSAのもの）と結合し、BSAとは結合しない抗体を産生する4個のハイブリドーマを確認した。

#### 〔4〕ハイブリドーマサブクローニング

(1) 前記の4個のハイブリドーマを、限界希釈法にてサブクローニングした。

これらのハイブリドーマの細胞数を、トリパン青染料排除法及び血球計により計数を行った。

そして、これらのハイブリドーマを、100 $\mu$ lのHT培地当たり、0.5個の生育細胞数の割合と1個の生育細胞数の割合の2種類の割合で懸濁し、96穴

の平底マイクロプレートの1ウェル当たり100 $\mu$ lずつ分注した。

これを、2～3日毎に培地を交換して、ハイブリドーマを増殖させた。

(2) 2週間後、顕微鏡下で各ウェルのコロニー数を調べ、そして配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)と結合し、BSAとは結合しない抗体を産生するウェルを前記と同様にしてELISA法で調べた。

1ウェル中に1コロニーが存在し、そしてこのような抗体を産生するウェルを4個得た。

(3) これを、24穴のプレートに移し、細胞生育が良好となるまで2週間培養を行った。

(4) 次に、これらのハイブリドーマが産生する抗体のアポリポタンパク質(a)との反応性をウェスタンブロット法で調べた。

操作は、参考例6の(2)で1種類の精製アポリポタンパク質(a)のみを泳動させることと、実施例11で得られたアポリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体に代えてハイブリドーマの培養上清を用いる他は、参考例6と同様にして行った。

この結果、1個のハイブリドーマが、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリポタンパク質(a)に対する抗体を産生する細胞株であることが判明した。

(5) このハイブリドーマを、再度前記(1)及び(2)と同様にしてクローニングを行い、それぞれのウェルについて抗体の産生を調べたところ、1ウェル中に1コロニーのハイブリドーマが存在し、そして配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである実施例8で得た抗体産生用免疫原(担体がBSAのもの)と結合し、BSAとは結合しない抗体を産生するものを全部で15クローン得た。

(6) これらのハイブリドーマのクローンが産生する抗体のアポリポタンパク

質（a）との反応性を、再度前記（4）と同様にしてウエスタンブロット法で調べた。

これより、これら全てのハイブリドーマのクローンが、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリポタンパク質（a）に対する抗体を産生する細胞であることが確かめられた。

（7） これを本発明の配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株〔161E2H6株〕とした。

このハイブリドーマ細胞株〔161E2H6株〕は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-4378として平成5年8月4日付けにて寄託されている。

#### 〔5〕モノクローナル抗体の産生

（1） 得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体産生細胞株を、中型ボトル（ヌンク社製）の中で、底面の約8割を細胞が占めるまでHT培地中で培養を行った。

（2） その後、これらのハイブリドーマを掻き取り、そして200g、5分間の遠心分離を行い集めた。

次に、これを血清を含まないRPMI 1640培地液で3回洗浄した後、2mlのRPMI 1640培地液に懸濁した。

（3） 前もって2，6，10，14-テトラメチルペンタデカンで処置しておいたオスのBALB/cマウス（日本チャールズリバー社）の腹腔に、前記（2）で得たハイブリドーマ懸濁液1mlを注射した。

注射から2週間以内に腹部の膨張が認められなかった場合には、再度これを繰り返した。

（4） このマウスの腹部の膨張が認められたときに腹水を採取した。

これを200g、5分間の遠心分離にかけ、アポリポタンパク質（a）に対す

るモノクローナル抗体を含む上澄み液をハイブリドーマから分離して取得した。

〔6〕モノクローナル抗体の精製

(1) アポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を含む上澄み液の 10 ml に、22℃で硫酸ナトリウム 1.8 g を攪拌しながら加え、硫酸ナトリウムが完全に溶けてから更に 1 時間攪拌を続けて塩析を行った。

(2) これを 22℃で遠心分離 (7000 g, 15 分間) を行い、上澄み液と分離して得た沈澱を、30 mM 塩化ナトリウムを含む 40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) 2 ml に溶解した。

(3) 次に、これを 30 mM 塩化ナトリウムを含む 40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) に対して十分に透析した後、1000 g で 20 分間遠心分離し不溶性のものを除去した。

(4) これを 30 mM 塩化ナトリウムを含む 40 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) で平衡化しておいた DEAE-セルロースイオン交換カラム (セルバ社製) [1 × 10 cm] に流速 0.4 ml/分を通して、溶出液を 2 ml ずつ集めた。

(5) 免疫グロブリン G (IgG) が溶出液の素通り画分に含まれていることを 280 nm の吸光度より確認し、これを集めて 2 ml に濃縮した。

(6) 更に、これをプロテイン A-セファロース CL-4B アフィニティークロマトグラフィー (ファルマシア-エルケービー社製) にかけて精製を行い、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を特異的に認識するアポリポタンパク質 (a) に対するマウスモノクローナル抗体を得た。

なお、この得られたモノクローナル抗体の量はタンパク質量で 10 mg であった。

また、ここで得たアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体の抗体クラスとサブタイプは、市販の特異抗マウス免疫グロブリン抗血清 (ダコ社製) を用いたオクタロニイ免疫拡散法により IgG<sub>1</sub>、 $\lambda$  鎖と決定した。

参考例 1 1 実施例 2 3 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体の配列表の配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 1 0 で示されるペプチドへの反応性

実施例 2 3 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体の、配列表の配列番号 1、配列番号 2 及び配列番号 3 で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含むペプチドである配列表の配列番号 8、配列番号 9 及び配列番号 1 0 で示されるペプチドへの反応性を E L I S A 法で確かめた。

実施例 2 2 で得られたリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体に代えて、実施例 2 3 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いることと、この抗体の試料濃度を  $5.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  及び  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  とすること以外は、参考例 1 0 と同様にして測定を行った。

この測定の結果を図 2 7 に示した。なおここでは、各試料の吸光度から対照の吸光度を引いたものを図に示した。

図 2 7 において、1、2 及び 3 はそれぞれ実施例 6 で得られた抗体産生用免疫原、実施例 7 で得られた抗体産生用免疫原及び実施例 8 で得られた抗体産生用免疫原に対しての測定値 (吸光度) を示す。

この結果より、実施例 2 3 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体は、配列表の配列番号 1 及び配列番号 2 で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含むペプチドである配列表の配列番号 8 及び配列番号 9 で示されるペプチドとは結合せず、配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を含むペプチドである配列表の配列番号 1 0 で示されるペプチドを特異的に認識して結合することが確かめられた。

参考例 1 2 実施例 2 3 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体のアポリポタンパク質 (a) への反応性

実施例 2 3 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体

のアポリポタンパク質 (a) への反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

操作は、泳動を行うヒト血清由来の精製アポリポタンパク質 (a) の数が5種類であることと、実施例11で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体に代えて、実施例23で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いる他は、参考例6と同様にして行った。

このウエスタンブロット法の結果を図28、図29及び図30に示した。

図28は、実施例23で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を作用させたものである。

図28において、1ないし5は5種類のヒト血清由来の精製アポリポタンパク質 (a) それぞれを泳動したものであり、Bは泳動位置の目安としてアポリポタンパク質B-100の位置を示すものである。

なお、このアポリポタンパク質B-100のバンドの位置との関係から [G. Utermann et al., J. Clin. Invest., 80, 458-465 (1987)]、1ないし5のバンドはアポリポタンパク質 (a) のイソ型のF型、B型、S1型、S2型、S3型及びS4型を示していることがわかる。

図29は陰性対照のものであり、ここで1ないし5は5種類のヒト血清由来の精製アポリポタンパク質 (a) それぞれを泳動させたものである。また、Rは目安として、前記1のバンドの血清由来の精製アポリポタンパク質 (a) の泳動位置を示すものである。

図30は対照としてアポリポタンパク質 (a) と反応する抗リポタンパク質 (a) 抗体を作用させたものであり、試料として前記の1のバンドの血清由来の精製アポリポタンパク質 (a) を用いた。また、Bは目安としてアポリポタンパク質B-100の泳動位置を示すものである。

図28及び図30によると、実施例23で得られたアポリポタンパク質 (a)

に対するモノクローナル抗体は、アポリポタンパク質（a）と反応する抗リポタンパク質（a）抗体と同じ位置に発色を示すことから、特異的にアポリポタンパク質（a）と結合することが確かめられた。

また、図28において、実施例23で得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体は、アポリポタンパク質（a）の種々のイソ型と反応することが確認された。

そして、図29において、実施例23で得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体及びアポリポタンパク質（a）と反応する抗リポタンパク質（a）抗体を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

参考例13 実施例22で得られたリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体のリポタンパク質（a）への反応性

実施例22で得られたリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体のリポタンパク質（a）への反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

操作は、実施例11で得られたアポリポタンパク質（a）に対するポリクローナル抗体に代えて、実施例22で得られたリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体をそれぞれ用いる他は、参考例7と同様にして行った。

このウエスタンブロット法の結果を図31に示した。

図31において、Pは対照、Nは陰性対照、2は実施例22で得られたリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体を作用させたもの、そして3は実施例23で得られたアポリポタンパク質（a）に対するモノクローナル抗体を作用させたものである。

図31における対照との比較より、実施例22で得られたリポタンパク質

(a) に対するモノクローナル抗体は、市販の抗リポタンパク質 (a) 抗体と同じ位置に発色を示すことから、特異的にリポタンパク質 (a) と結合することが確かめられた。

また、実施例 23 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体は、市販の抗リポタンパク質 (a) 抗体で発色を示す位置には発色を認めないことから、リポタンパク質 (a) とは結合しないことが確かめられた。

更に、実施例 22 で得られた抗体、実施例 23 で得られた抗体及び市販の抗リポタンパク質 (a) 抗体を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

参考例 14 実施例 22 で得られたリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体の LDL への反応性

実施例 22 で得られたリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体それぞれの LDL への反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

(1) LDL 濃度が高いヒト血清を、超遠心分離を行い比重が 1.006 以上かつ 1.063 以下の部分を分取し、抗リポタンパク質 (a) 抗体 (イムノ社製) をリガンドとして結合させたアフィニティークロマトグラフィーにかけて素通り画分を分取して、精製 LDL を得た。

(2) この LDL を 0.5 mg/ml になるように生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) に溶解し、この 2  $\mu$ l を試料としてタイタン・ジェル・リボ蛋白電気泳動キット (ヘレナ研究所社製) を用いて電気泳動を行った。なお、支持体はアガロースゲルであり、泳動緩衝液はバルビタール緩衝液 (pH 8.8) を使用して、電圧 90 V で 75 分間通電して行った。

(3) 転写はノバ・プロット・エレクトロフォレティック・トランスファー・キット (ファルマシアーエルケービー社製) を用いて、その使用説明書に従い、



ドライ方式で行った。

(4) 転写用装置上に置いた(2)のアガロースゲルの上に、9 cm×9 cmのニトロセルロース膜(バイオラッド社製)を重ね、48 mMトリス、39 mMグリシン、0.0375% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、20% (V/V) メタノールよりなる転写用緩衝液を用いて、電流65 mAで2時間転写を行った。

(5) 転写を行ったニトロセルロース膜を、1% BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水(5.59 mMリン酸水素二ナトリウム、1.47 mMリン酸二水素カリウム、137 mM塩化ナトリウム、2.68 mM塩化カリウム(pH 7.2)) 20 mlに4℃で1晩浸漬して、ブロッキングを行った。

(6) 次にこれを洗浄液(0.05% ツイーン20(Tween 20)を含むリン酸緩衝生理食塩水) 20 ml中で10分間振とう洗浄を行った。この操作を3回行った。

(7) 実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体のそれぞれを、20 mlのリン酸緩衝生理食塩水に80 µgずつ溶解し、この2種類の溶液に(6)の操作を行ったニトロセルロース膜それぞれを室温で2時間浸漬して反応させた。

(8) なお対照として、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体の代わりに、LDLの構成成分のアポリポタンパク質B-100に対する同濃度のヤギ抗アポリポタンパク質B抗体(インターナショナルエンザイム社製)を用いて、前記(7)の操作を行った。

また、(6)で得られたニトロセルロース膜に、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体並びにヤギ抗アポリポタンパク質

B抗体のいずれも作用させないものを陰性対照として用意した。

(9) 前記(7)又は(8)の操作を行ったニトロセルロース膜を洗浄液20 mlで10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

(10) 次にパーオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(ダコ社製)及びパーオキシダーゼ標識抗ヤギIgG抗体(ダコ社製)を3%BSAを含むリン酸緩衝生理食塩水で500倍希釈をして20mlの溶液を調製し、これにニトロセルロース膜を室温で2時間浸漬して反応させた。

(11) このニトロセルロース膜を洗浄液20mlで10分間振とう洗浄を行った。これを3回行った。

(12) 0.025%3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩及び0.01%過酸化水素を含むリン酸緩衝生理食塩水20mlに室温で15分間(11)のニトロセルロース膜を浸漬して発色させた。

このウェスタンブロット法の結果を図32に示した。

図32において、Pは対照、Nは陰性対照、2は実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体を作用させたもの、そして3は実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体を作用させたものである。

図32における対照との比較より、実施例22で得られたリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体及び実施例23で得られたアポリポタンパク質(a)に対するモノクローナル抗体それぞれは、市販の抗アポリポタンパク質B抗体で発色を示す位置には発色を認めないことから、LDLとは結合しないことが確かめられた。

更に、実施例22で得られたモノクローナル抗体、実施例23で得られたモノクローナル抗体及び市販の抗アポリポタンパク質B抗体を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

参考例 1.5 実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体のプラスミノーゲンへの反応性

実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体それぞれのプラスミノーゲンへの反応性をウエスタンブロット法により確かめた。

操作は、実施例 9 及び実施例 10 で得られたリボタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体に代えて、実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体をそれぞれ用いる他は、参考例 4 と同様にして行った。

このウエスタンブロット法の結果を図 33 に示した。

図 33 において、P は対照、N は陰性対照、2 は実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を作用させたもの、そして 3 は実施例 23 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を作用させたものである。

これより、実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたアポリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体は、市販の抗プラスミノーゲン抗体で発色を示す位置に発色を示さないことから、プラスミノーゲンとは結合しないことが確かめられた。

また、実施例 22 で得られたモノクローナル抗体及び実施例 23 で得られたモノクローナル抗体等を作用させていない陰性対照に発色が見られないことから、非特異的な発色が起きていないことが示された。

#### 実施例 24 ELISA 法によるリボタンパク質 (a) 測定法

実施例 22 で得られたリボタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いて ELISA 法によるリボタンパク質 (a) 測定系を確立した。

実施例 17 (5) の実施例 9 で得られたリボタンパク質 (a) に対するポリク

ローナル抗体に代えて、同濃度の実施例 22 で得られたリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いること以外は、実施例 17 と同様にして測定を行った。

5 種類の試料を測定して得た検量線を図 34 に示した。

これより、本発明のリポタンパク質 (a) 測定法によりリポタンパク質 (a) を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例 25 リポタンパク質 (a) 測定値の比較

本発明の実施例 22 で得られたリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いたリポタンパク質 (a) 測定法 (ELISA 法) と A 社製リポタンパク質 (a) 測定試薬 (ELISA 法) とで測定値の比較を行った。

10 種類の血清よりなる試料 1 ないし試料 10 について、本発明の実施例 22 で得られたリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いたリポタンパク質 (a) 測定法 (ELISA 法) により測定を行った。なお、ELISA 法の操作は実施例 17 と同様にして行った。

また、A 社製リポタンパク質 (a) 測定試薬による 10 種類の試料の測定の操作は、使用説明書に従って行った。

これらの測定の結果を表 6 にまとめた。

表 6

	本発明測定法	A 社 製 試 薬
試料 1	6. 5	8. 0
試料 2	2. 2	3. 7
試料 3	33. 5	31. 0
試料 4	12. 5	10. 9
試料 5	14. 0	12. 5
試料 6	18. 0	17. 5
試料 7	6. 0	4. 5
試料 8	57. 5	54. 5
試料 9	9. 3	6. 4
試料 10	75. 0	72. 9

(単位はmg/dl)

これより、本発明のリポタンパク質 (a) 測定法によるリポタンパク質 (a) 測定値が、既存の測定法による測定値と同じ値を示すことがわかり、本発明のリポタンパク質 (a) 測定法は臨床検査の実用上問題がないことが確かめられた。

#### 実施例 26 ELISA法によるアポリポタンパク質 (a) 測定法

実施例 23 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いて ELISA 法によるアポリポタンパク質 (a) 測定系を確立した。

操作は、実施例 11 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するポリクローナル抗体に代えて、実施例 23 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いることと、アポリポタンパク質 (a) 濃度が 10mg/dl、20mg/dl、30mg/dl、40mg/dl、50mg/dl の 5 種類の試料を使用することの他は、実施例 20 と同様にして測定を行った。

5 種類の試料を測定して得た検量線を図 35 に示した。

これより、本発明のアポリポタンパク質 (a) 測定法によりアポリポタンパク質 (a) を定量的に測定できることが確かめられた。

#### 実施例 27 アポリポタンパク質 (a) 測定法における血清試料の影響

実施例 23 で得られたアポリポタンパク質 (a) に対するモノクローナル抗体を用いたアポリポタンパク質 (a) 測定法 (ELISA 法) において、血清試料の影響を受けないことを添加回収試験により確認した。

(1) 3 種類の血清 (A, B, C) を用意し、これをベースに以下の試料を調製した。

① 3 種類の血清 (A, B, C) 0.9 ml に対して生理食塩水 (0.9% 塩化ナトリウム水溶液) 0.1 ml をそれぞれ添加混合した 3 種類の試料。

② 3 種類の血清 (A, B, C) 0.9 ml に対して、生理食塩水で 100 mg/dl とした実施例 20 で得た精製アポリポタンパク質 (a) 0.1 ml をそれぞれ添加混合することにより、① で調製した 3 種類の血清試料のアポリポタンパク質 (a) 濃度を 10 mg/dl 増加させた 3 種類の試料。

③ 実施例 20 で得た精製アポリポタンパク質 (a) を生理食塩水で希釈して 10 mg/dl とした試料。

(2) 前記の 7 種類の試料について、実施例 26 の ELISA 法によるアポリポタンパク質 (a) 測定法により測定を行い、それぞれの試料の吸光度値を求めた。この結果を表 7 にまとめた。

表 7

	血清 A	血清 B	血清 C
① 血清と生理食塩水を混合した試料の吸光度	0.087	0.109	0.065
③ 10mg/dl の精製アポリポタンパク質 (a) の吸光度	0.168	0.168	0.168
④ ①の血清試料のアポリポタンパク質 (a) 濃度を10mg/dl 増加させた時の理論上の吸光度 (①+③)	0.255	0.277	0.233
② ①の血清試料のアポリポタンパク質 (a) 濃度を10mg/dl 増加させた時の測定で得た吸光度	0.244	0.275	0.242
⑤ 吸光度の測定値の理論値に対する比率 (②/④)	95.7%	99.3%	104%

これより、本発明のアポリポタンパク質 (a) 測定法では、血清試料の測定でもほぼ理論値どおりの測定値が得られることが判明した。

よって、本発明のアポリポタンパク質 (a) 測定法は、血清試料による非特異的反応等の影響を受けずに、血清試料中のアポリポタンパク質 (a) を正確に測定できる方法であることがわかり、臨床検査の実用上問題がないことが確かめられた。

#### 産業上の利用可能性

本発明のリポタンパク質 (a) に対する抗体は、LDL及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさず特異的にリポタンパク質 (a) を認識する抗体である。よって、LDL又はプラスミノーゲンに対する吸収操作、そしてLDL及びプラスミノーゲンと交叉反応のない抗体の産生細胞株の選択操作等の煩雑な操作を必要とせず、従来のリポタンパク質 (a) に対する抗体に比べ手間、時間、コストが

かからずに得られるという利点を有するものである。

そして、本発明のリポタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたペプチド及びリポタンパク質（a）に対する抗体の抗体産生用免疫原は、煩雑で熟練を要する生体試料よりの精製操作が不要であり、かつ長期間安定に保存することができるという長所を持つものである。

更に、本発明のリポタンパク質（a）測定法は、試料中のLDL及びプラスミノーゲンを測りこんでしまうことがなく、正確なリポタンパク質（a）濃度を定量できる測定法である。

また、本発明のアポリポタンパク質（a）に対する抗体は、リポタンパク質（a）及びプラスミノーゲンと交叉反応を起こさず特異的にアポリポタンパク質（a）を認識する抗体である。よって、リポタンパク質（a）又はプラスミノーゲンに対する吸収操作、そしてリポタンパク質（a）及びプラスミノーゲンと交叉反応のない抗体の産生細胞株の選択操作等の煩雑な操作を必要とせず、従来のアポリポタンパク質（a）に対する抗体に比べ手間、時間、コストがかからずに得られるという利点を有するものである。

そして、本発明のアポリポタンパク質（a）のアミノ酸配列より選択されたペプチド及びアポリポタンパク質（a）に対する抗体の抗体産生用免疫原は、煩雑で熟練を要する生体試料よりの精製操作が不要であり、かつ長期間安定に保存することができるという長所を持つものである。

更に、本発明のアポリポタンパク質（a）測定法は、試料中のリポタンパク質（a）及びプラスミノーゲンを測りこんでしまうことがなく、正確なアポリポタンパク質（a）濃度を定量できる測定法である。



## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val

1 5

配列番号 : 2

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg

1 5 10

配列番号 : 3

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro

1 5

配列番号 : 4

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Asp Ala Glu Gly Thr Ala

1 5

配列番号 : 5

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg

1 5

配列番号 : 6

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Ala Val Ala Ala Pro

1 5

配列番号 : 7

配列の長さ : 120

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg Pro Gly Val Gln Glu Cys Tyr His

1 5 10 15

Gly Asn Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Tyr Ser Thr Thr Val Thr Gly

20 25 30

Arg Thr Cys Gln Ala Trp Ser Ser Met Thr Pro His Ser His Ser Arg

35 40 45

Thr Pro Glu Tyr Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Ile Met Asn Tyr Cys Arg

50 55 60

Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro Tyr Cys Tyr Thr Arg Asp Pro Gly

65 70 75 80

Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Thr Gln Cys Ser Asp Ala Glu Gly

85 90 95

Thr Ala Val Ala Pro Pro Thr Val Thr Pro Val Pro Ser Leu Glu Ala

100 105 110

Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu

115 120

配列番号 : 8

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Cys Ser Asp Ala Glu Gly Thr Ala Val

1 5

配列番号 : 9

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Cys Glu Ala Pro Ser Glu Gln Ala Pro Thr Glu Gln Arg

1 5 10

配列番号 : 10

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 不明

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Cys Arg Asn Pro Asp Ala Val Ala Ala Pro

1 5 10

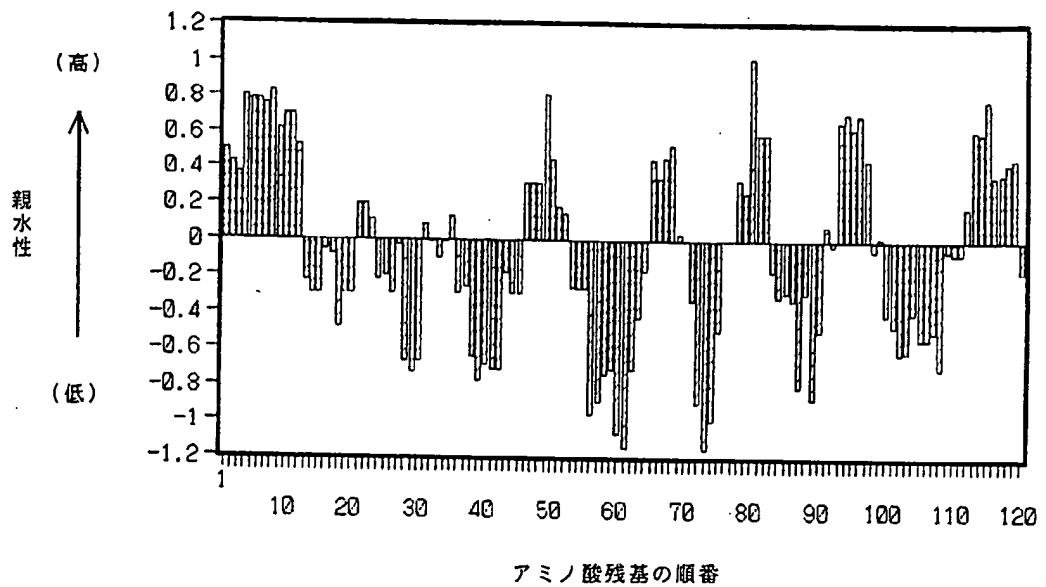
## 請 求 の 範 囲

1. リボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチド。
2. リボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチド。
3. アポリボタンパク質 (a) のアミノ酸配列より選択された配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチド。
4. 配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原。
5. 免疫原が、配列表の配列番号 1 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む 50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体とが結合したものである、請求の範囲第 4 項記載の免疫原。
6. 配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、リボタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原。
7. 免疫原が、配列表の配列番号 2 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む 50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体とが結合したものである、請求の範囲第 6 項記載の免疫原。
8. 配列表の配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む、50 以内のアミノ酸から構成されるペプチドよりなる、アポリボタンパク質 (a) に対する抗体を産生するための免疫原。

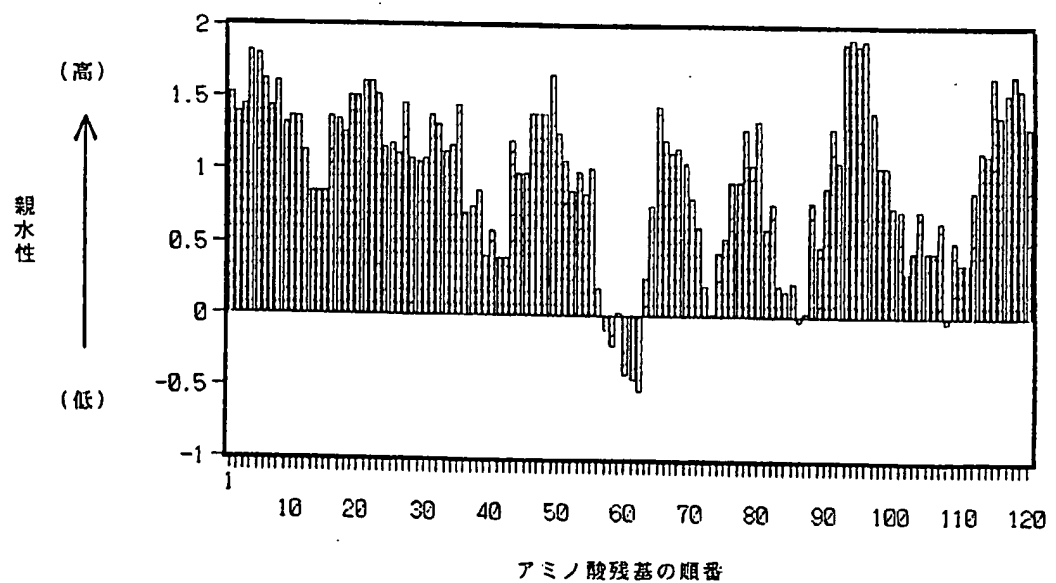
9. 免疫原が、配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を含む50以内のアミノ酸から構成されるペプチドと担体とが結合したものである、請求の範囲第8項記載の免疫原。
10. 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリポタンパク質(a)に対するポリクローナル抗体。
11. 配列表の配列番号1で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号4で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする請求の範囲第10項記載のポリクローナル抗体。
12. 請求の範囲第4項記載の免疫原より得られることを特徴とする請求の範囲第10項記載のポリクローナル抗体。
13. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するリポタンパク質(a)に対する抗体。
14. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号5で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする請求の範囲第13項記載の抗体。
15. 請求の範囲第6項記載の免疫原より得られることを特徴とする請求の範囲第13項記載の抗体。
16. モノクローナル抗体である請求の範囲第13項ないし第15項のいずれか1項に記載の抗体。
17. 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部又は全体を特異的に認識するアポリポタンパク質(a)に対する抗体。
18. 配列表の配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部が、配列表の配列番号6で示されるアミノ酸配列であることを特徴とする請求の範囲第17項記載の抗体。
19. 請求の範囲第8項記載の免疫原より得られることを特徴とする請求の範囲第17項記載の抗体。
20. モノクローナル抗体である請求の範囲第17項ないし第19項のいずれか1項に記載の抗体。

21. 請求の範囲第10項ないし第15項のいずれか1項に記載の少なくとも1種類の抗体を用いることを特徴とするリポタンパク質（a）の測定法。
22. 請求の範囲第16項記載の抗体を用いることを特徴とするリポタンパク質（a）の測定法。
23. 請求の範囲第17項ないし第19項のいずれか1項に記載の少なくとも1種類の抗体を用いることを特徴とするアポリタンパク質（a）の測定法。
24. 請求の範囲第20項記載の抗体を用いることを特徴とするアポリタンパク質（a）の測定法。

第1図

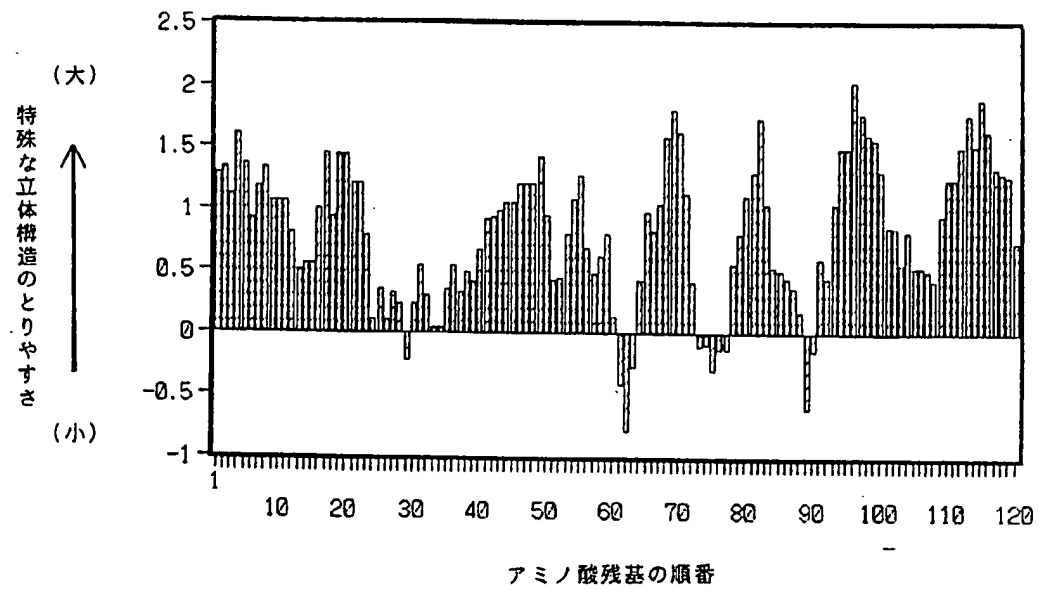


第2図





第3図



第4図

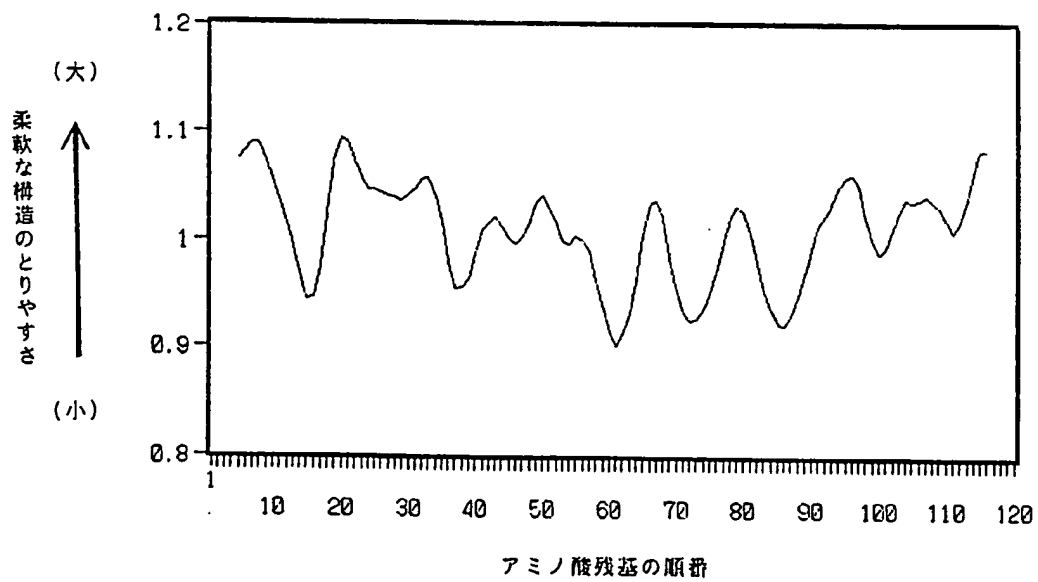
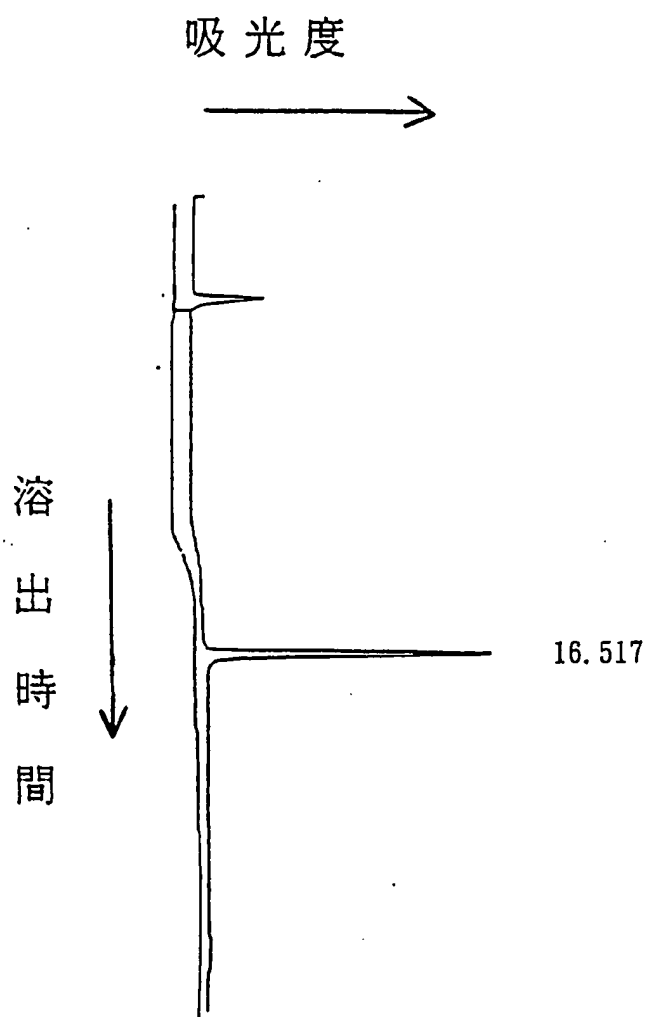


図 5



PKNO	TIME	AREA	CONC
1	16.517	26406	100
TOTAL		26406	100

第 6 図

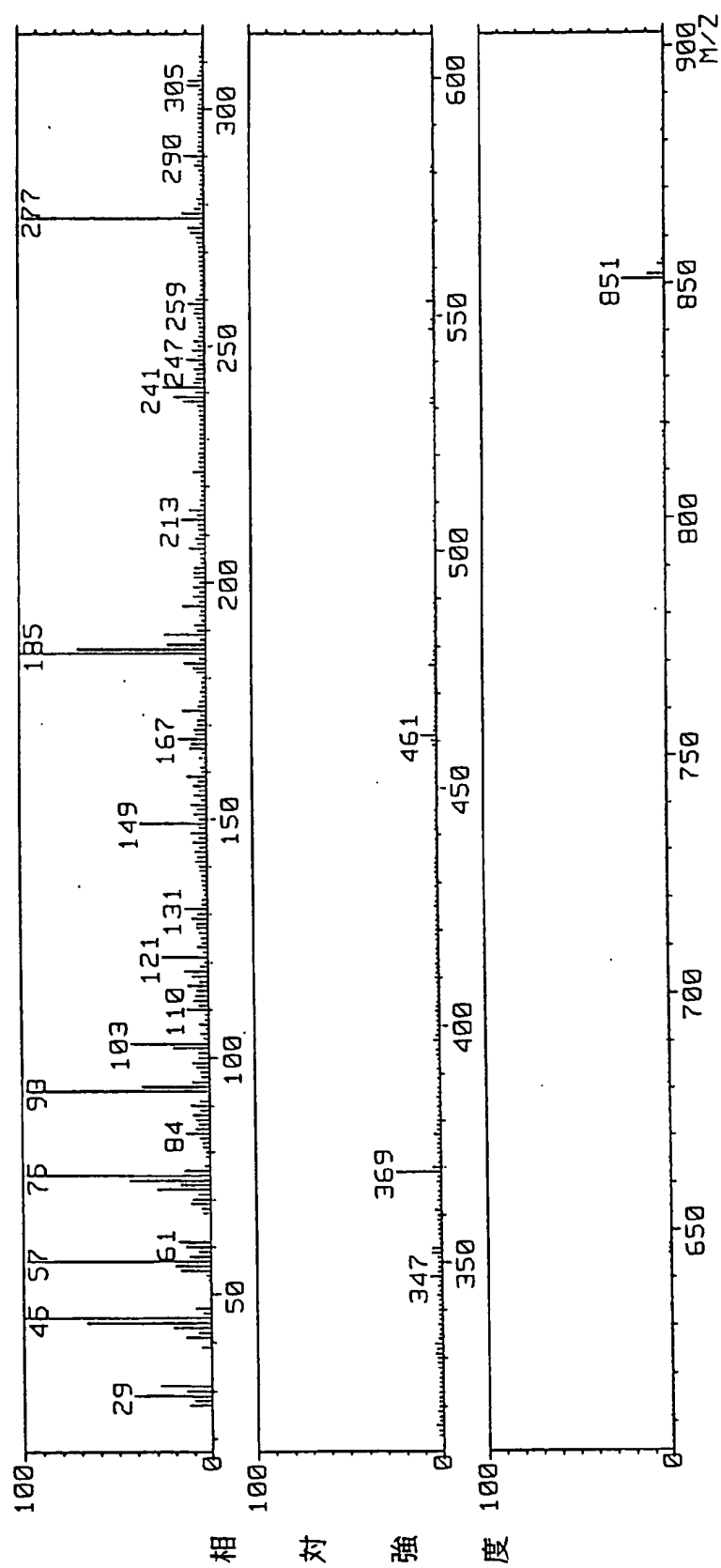
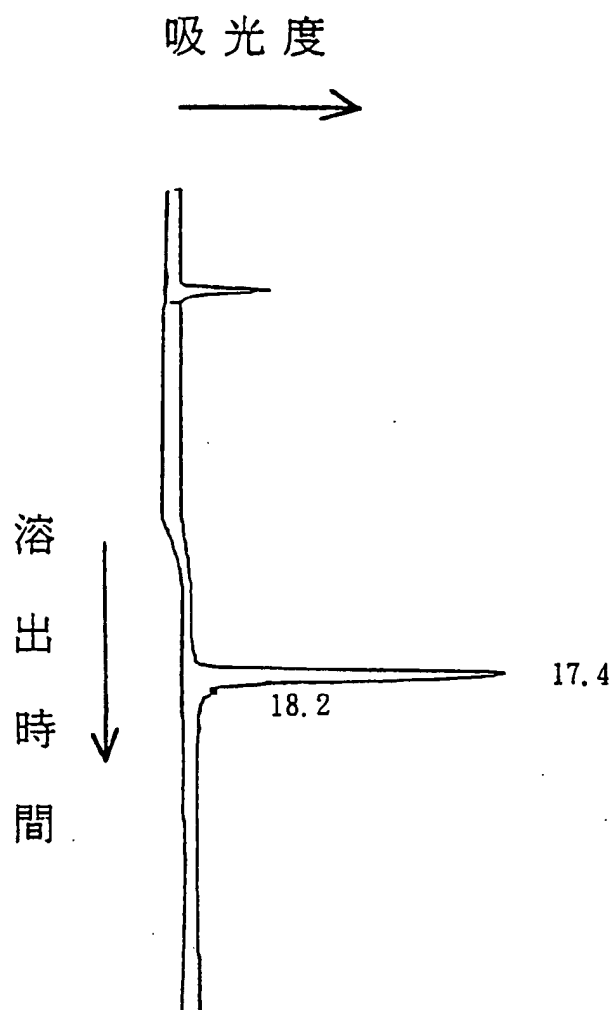
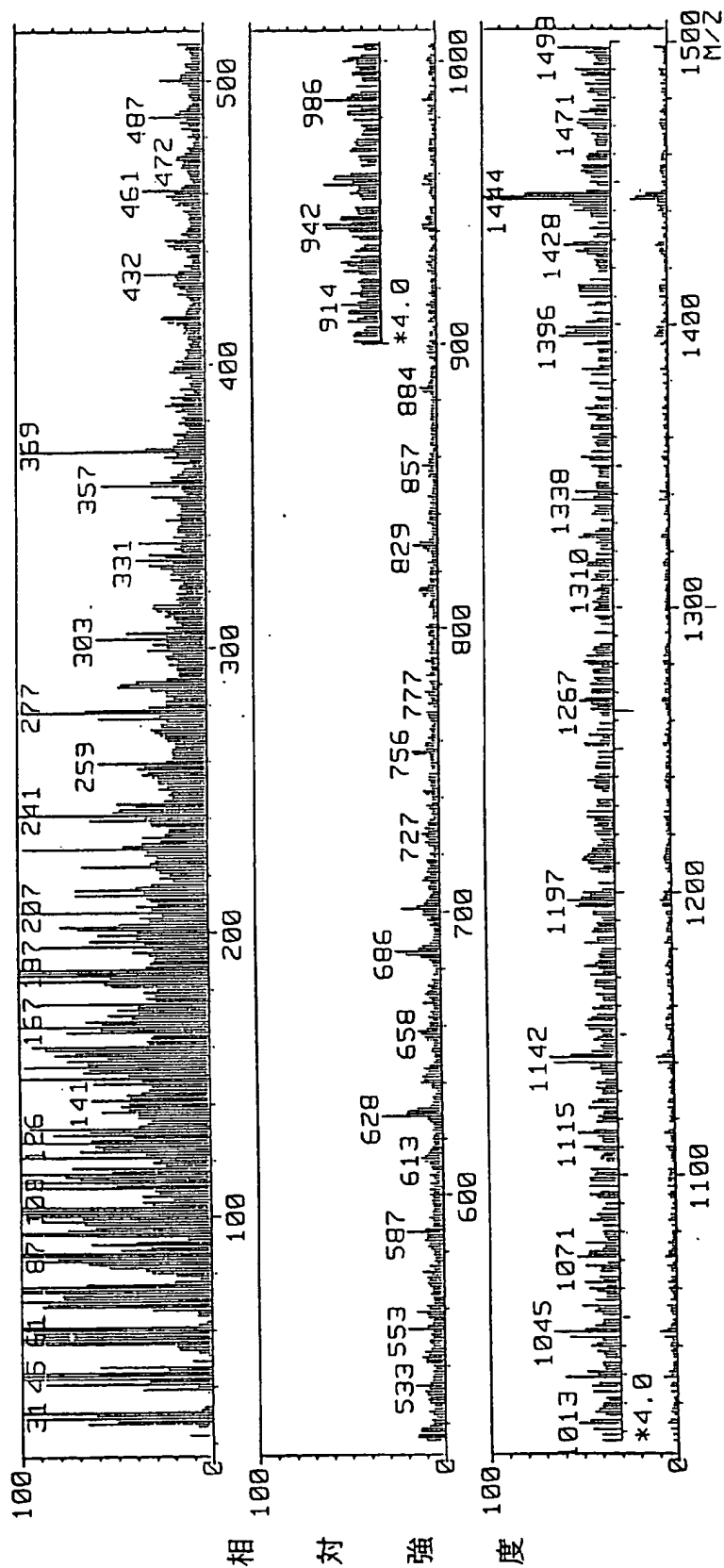


図 7



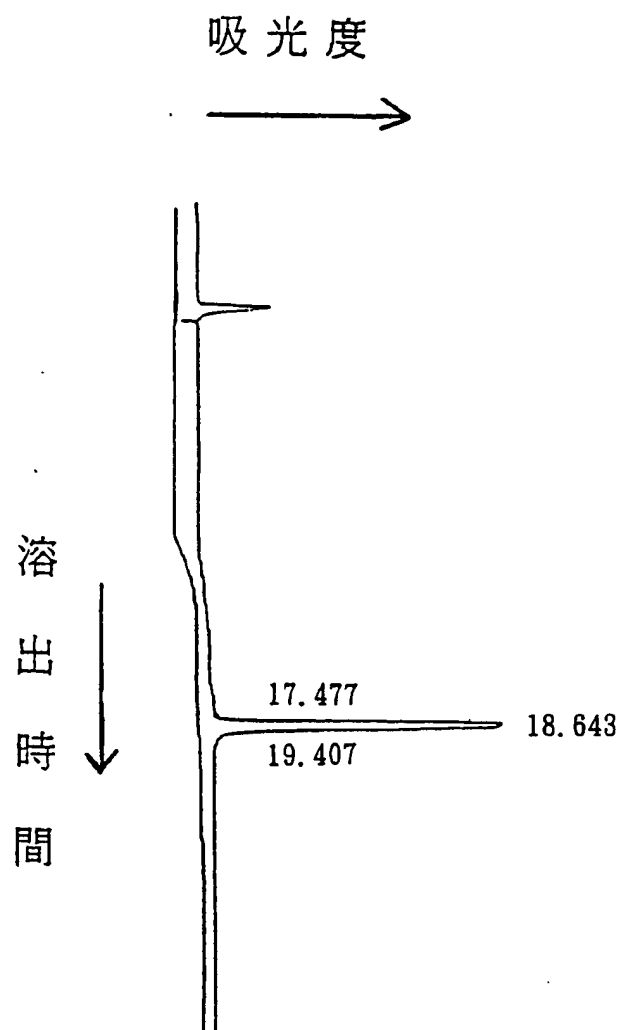
PKNO	TIME	AREA	CONC
1	17.4	57965	98.9036
2	18.2	643	1.0964
TOTAL		58608	100

第 8 図



16/23

図 9

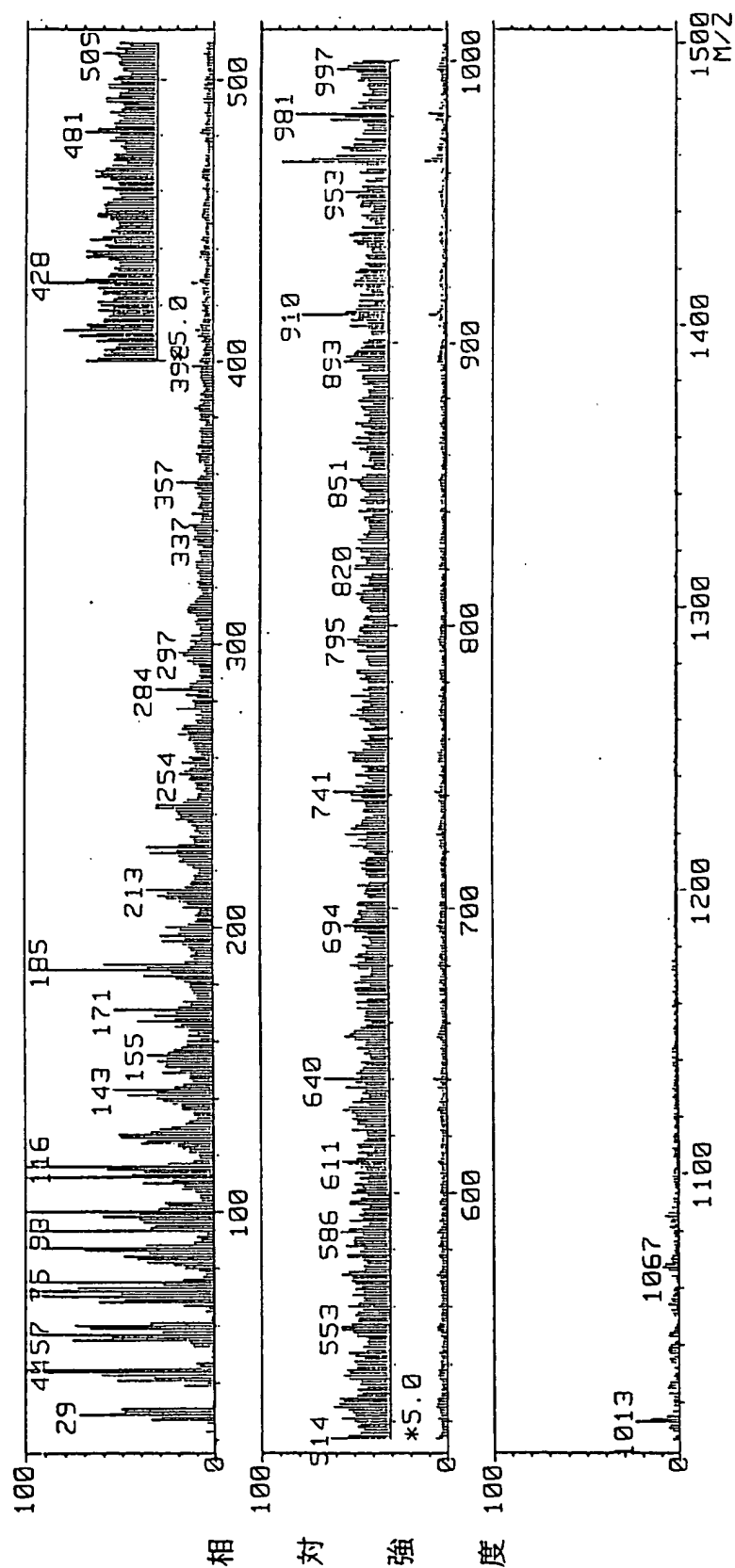


PKNO	TIME	AREA	CONC
1	17.477	250	0.6306
2	18.643	39191	99.059
3	19.407	123	0.3104
TOTAL		39563	100

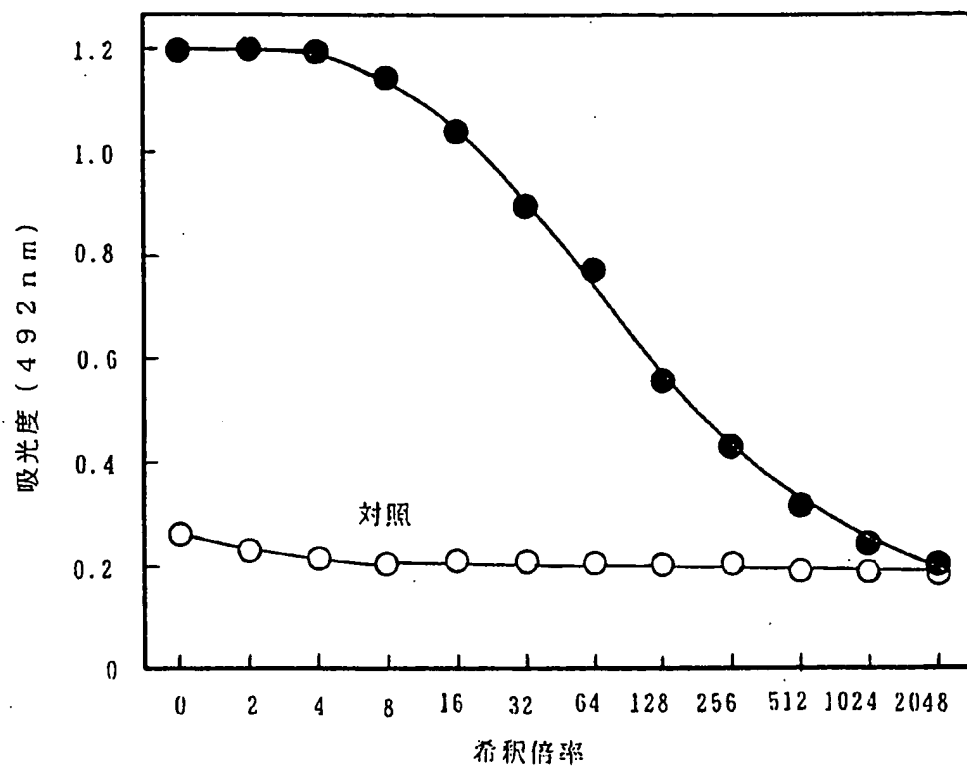
-7/23

新たな用紙

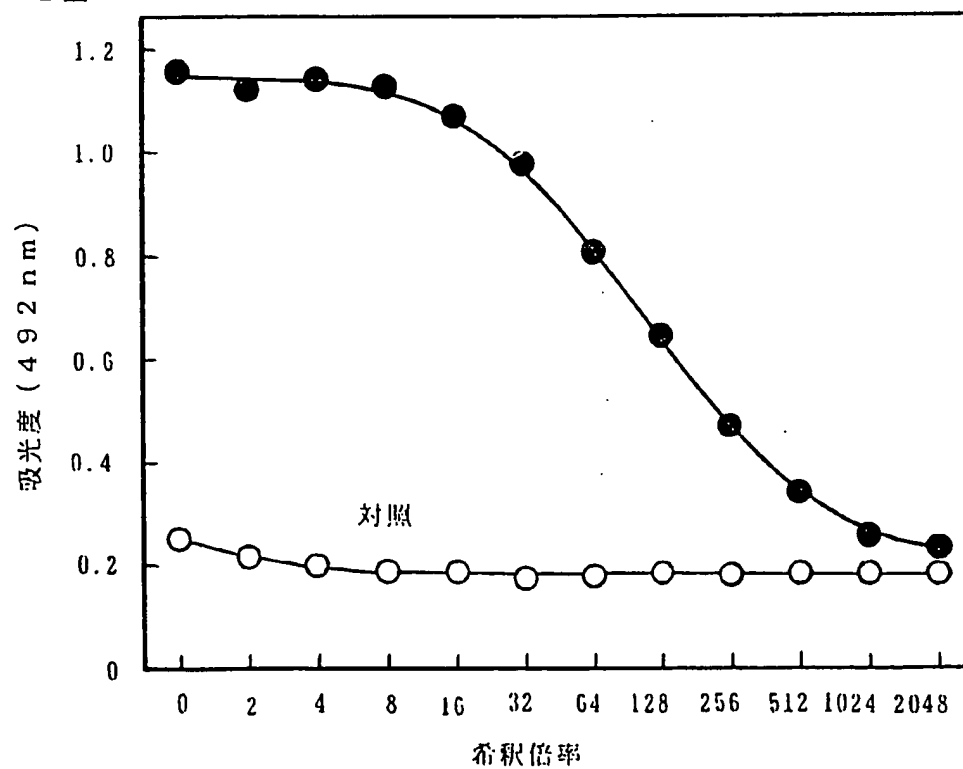
第 1 0 図



第 1 1 図

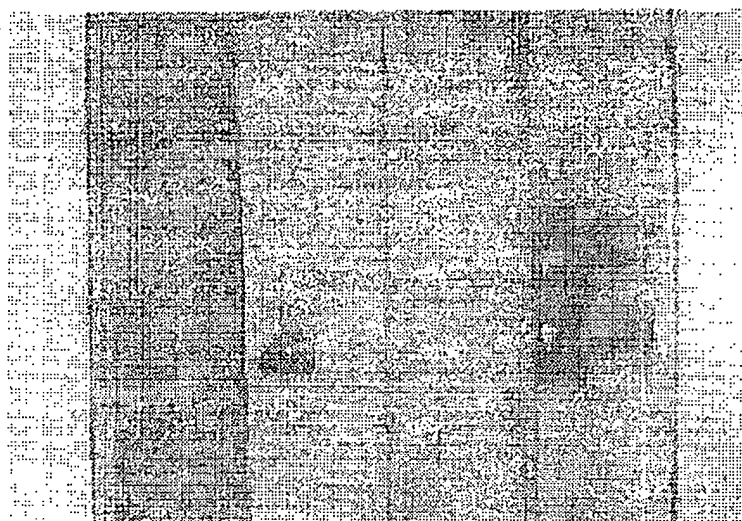


第 1 2 図



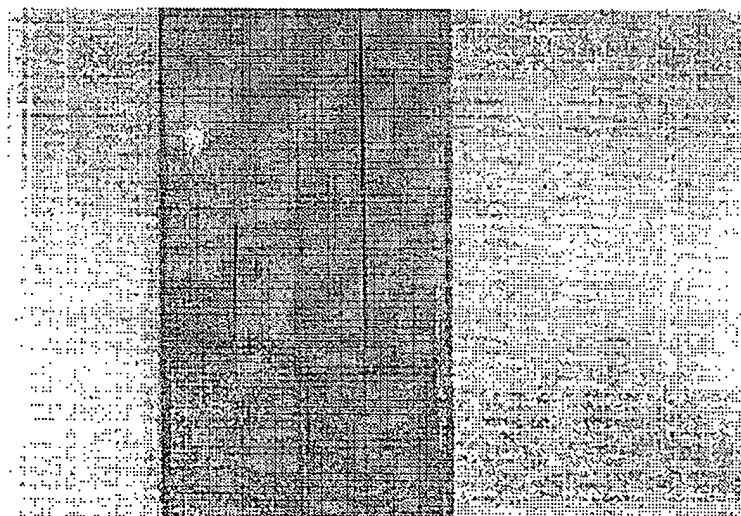


第 1 3 図



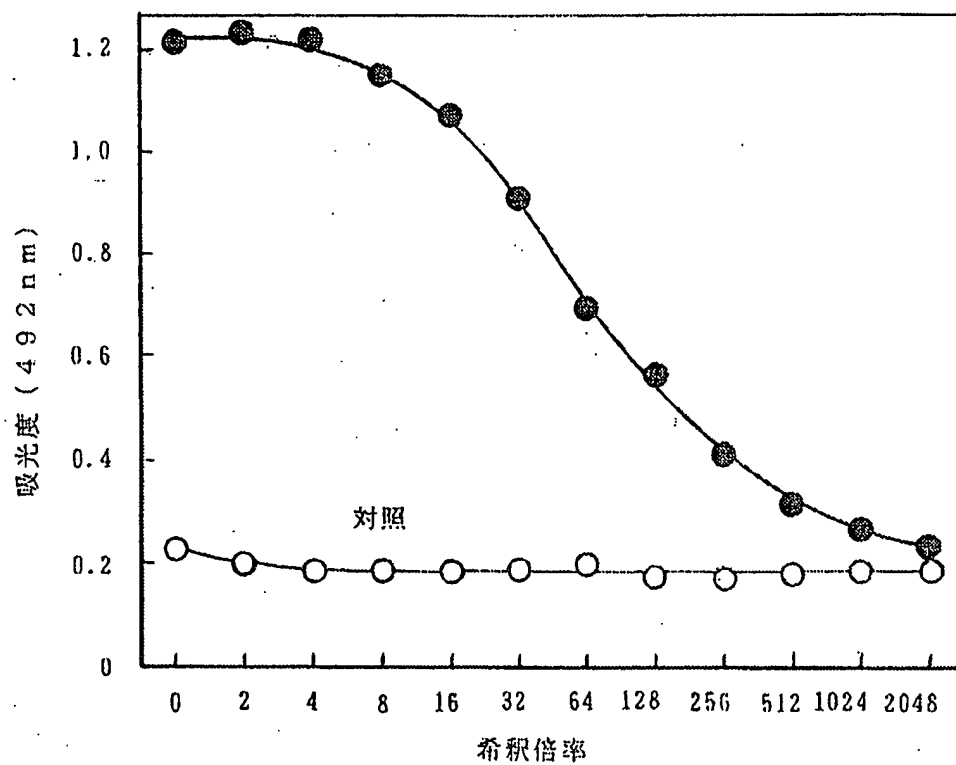
2 1 N P

第 1 4 図

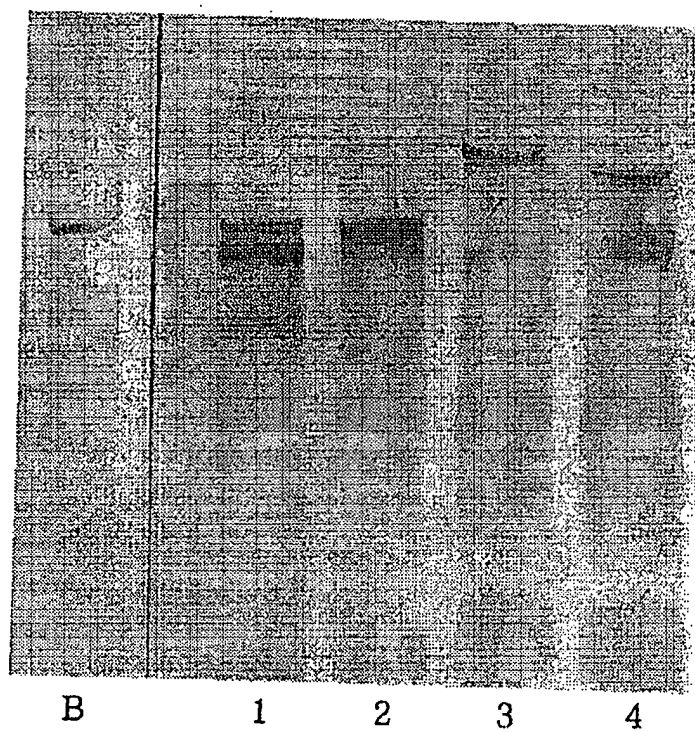


P N 1 2

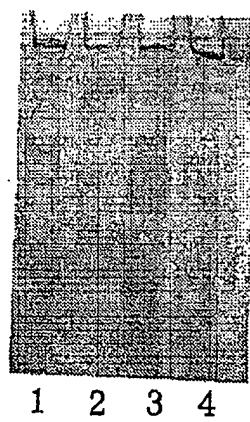
第 15 図



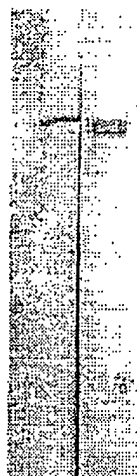
第 1 6 図



第 1 7 図

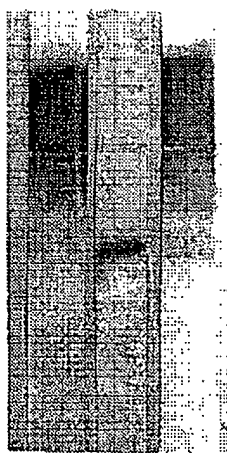


第 1 8 図



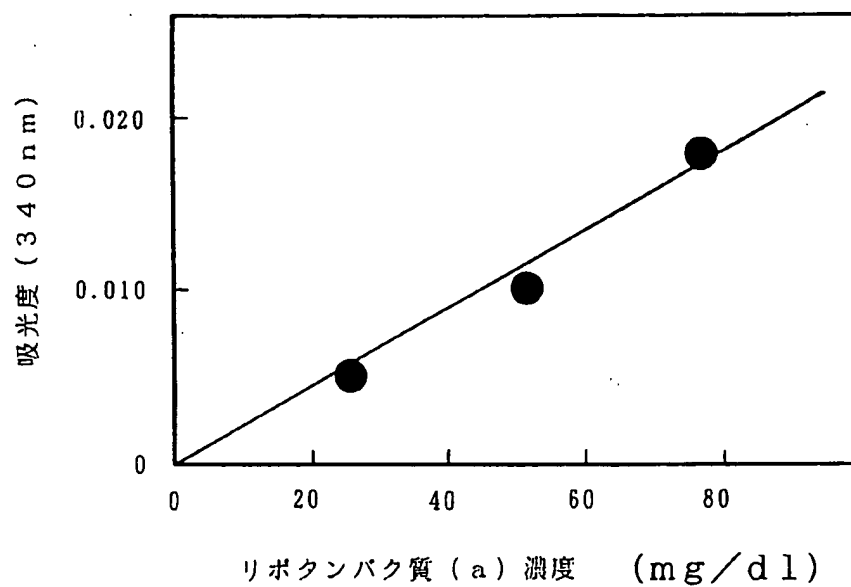
B 1

第 1 9 図

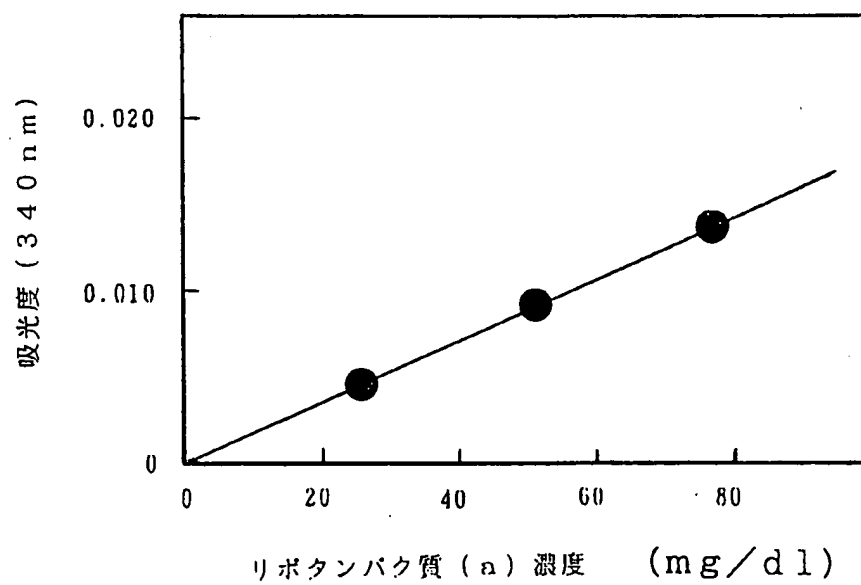


S P N

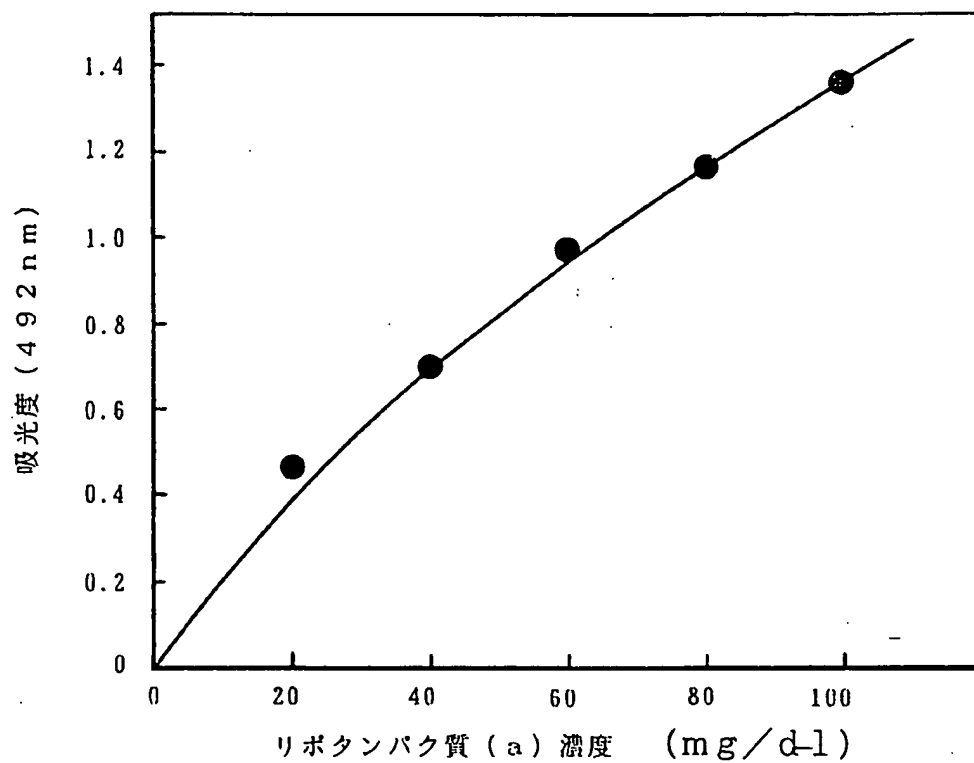
第20図



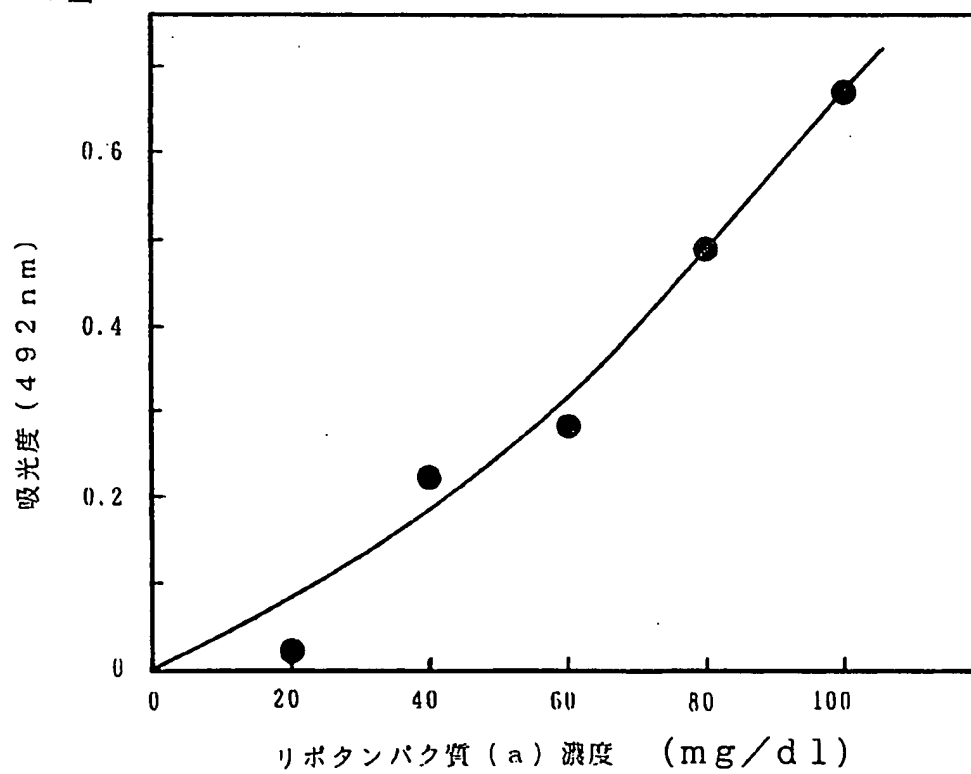
第21図



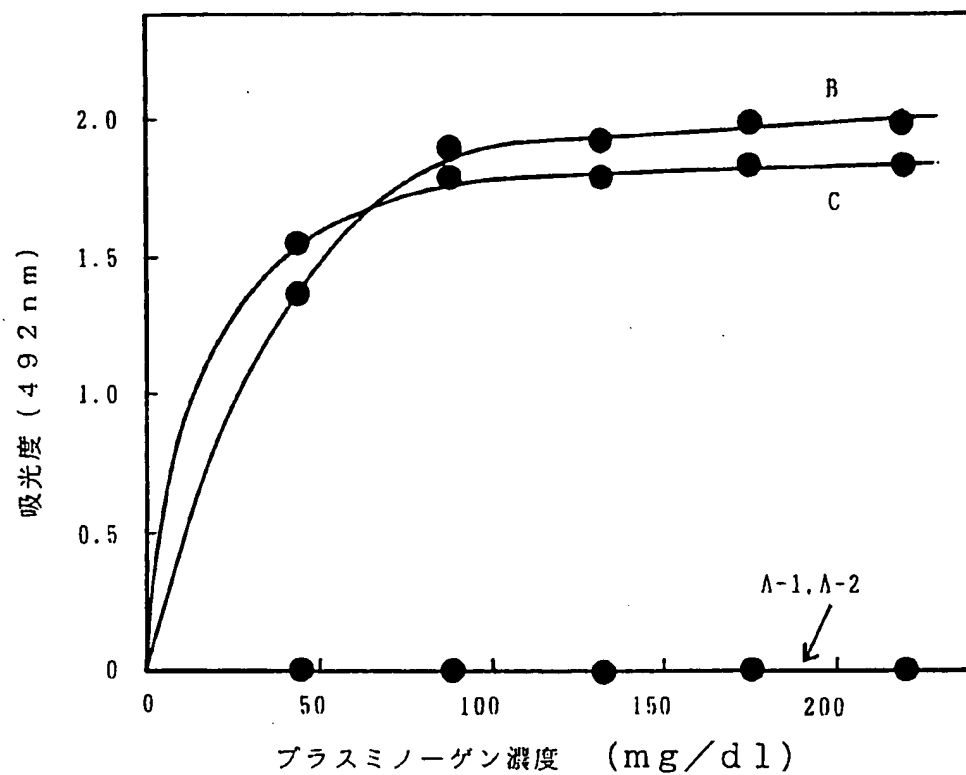
第 2 2 図



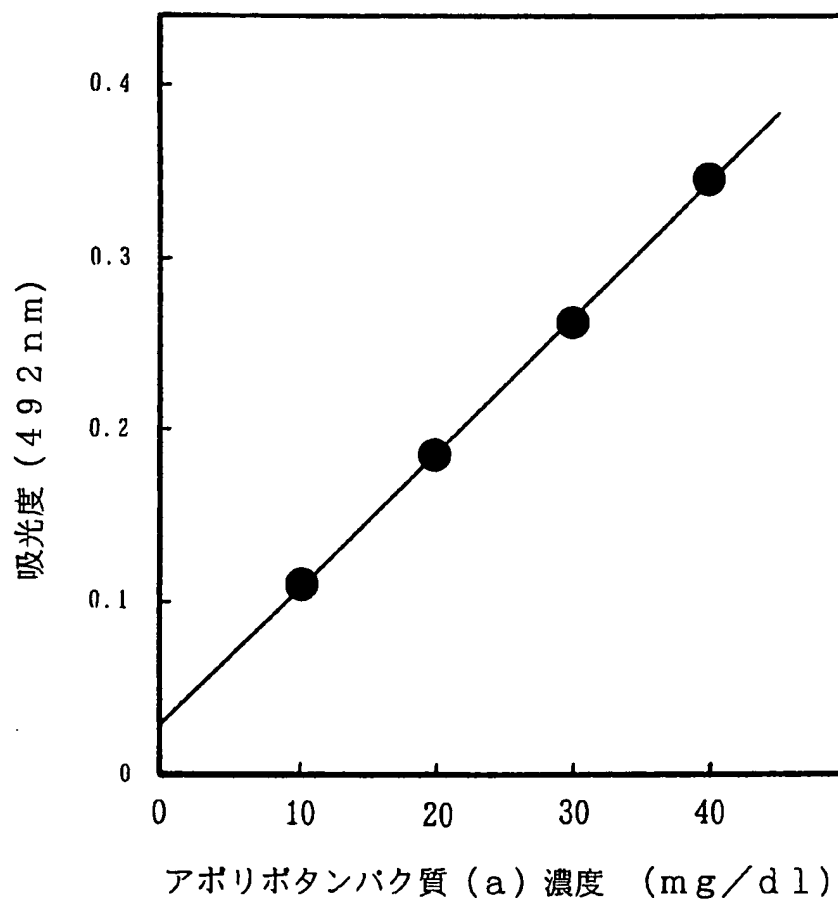
第 2 3 図



第24図

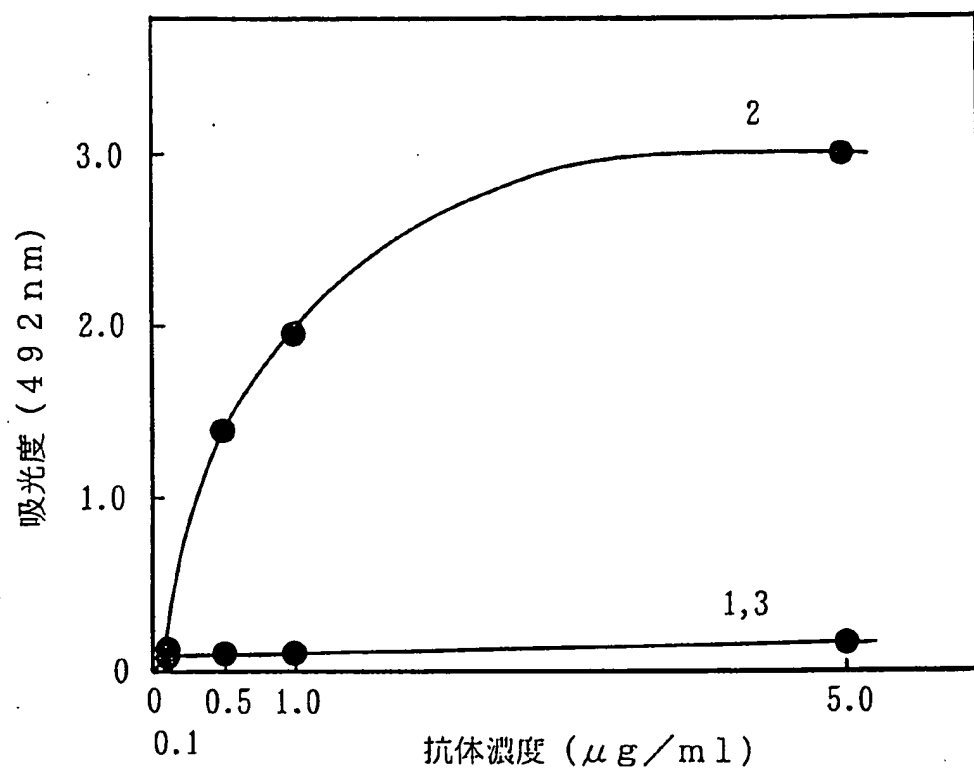


第 2 5 図

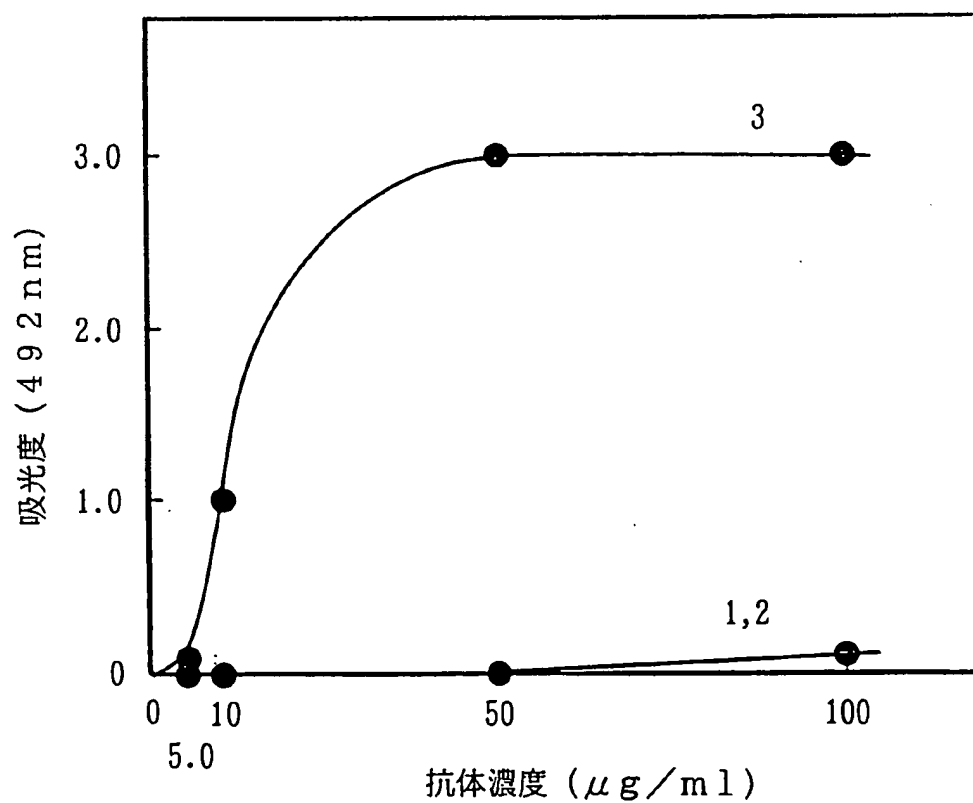




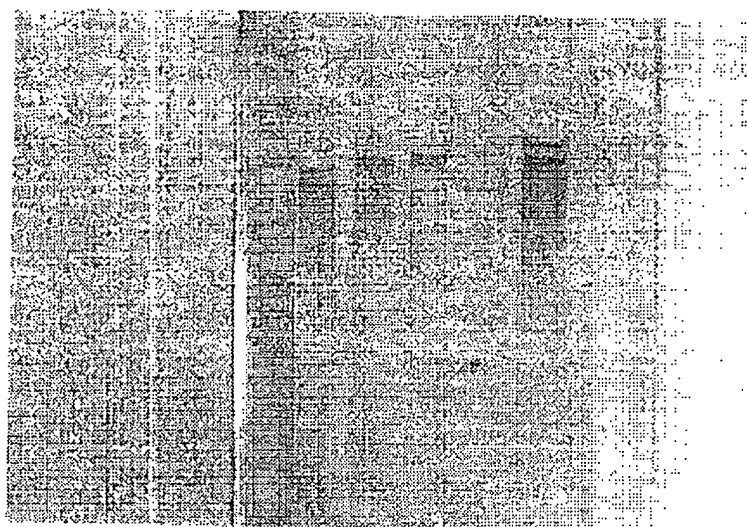
第 26 図



第 27 図

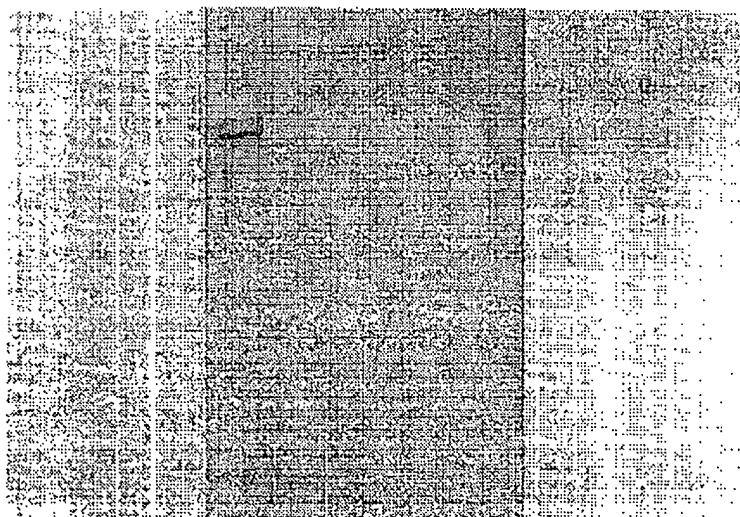


第 2 8 図



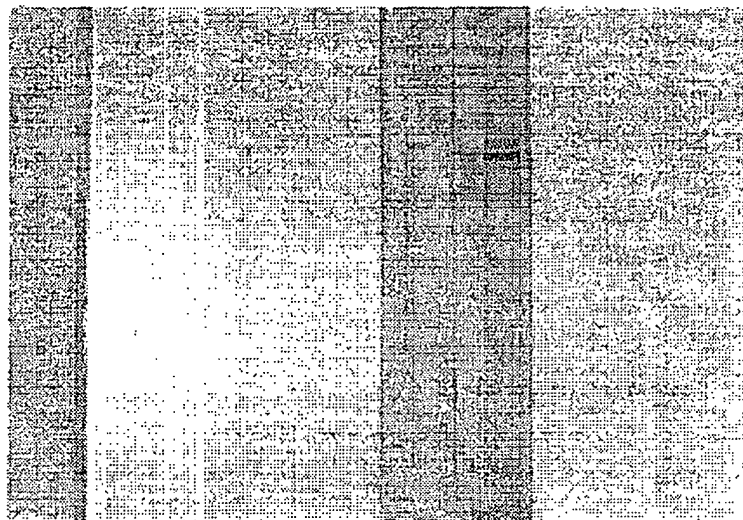
B 1 2 3 4 5

第 2 9 図



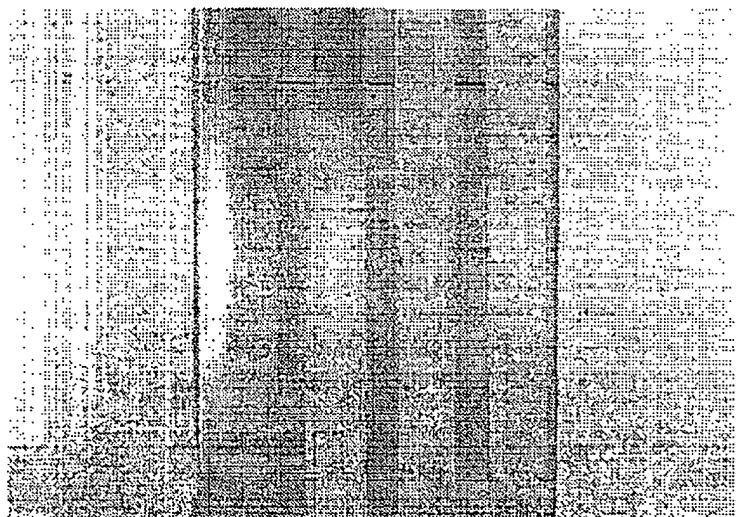
R 1 2 3 4 5

第 3 0 図



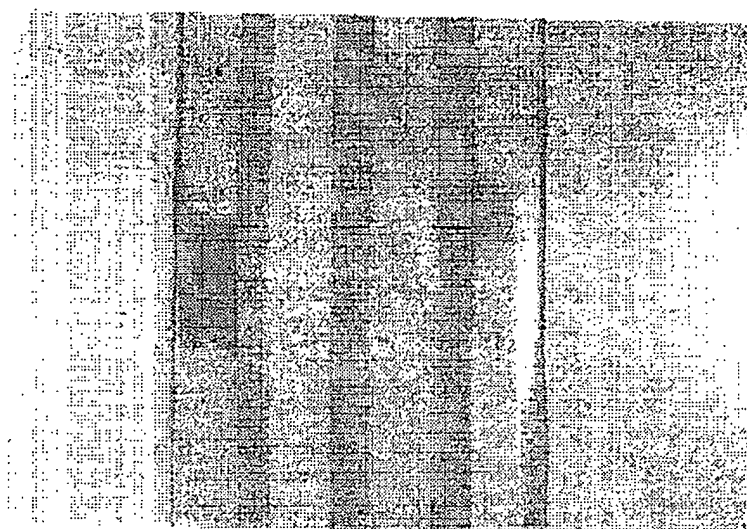
B 1

第 3 1 図



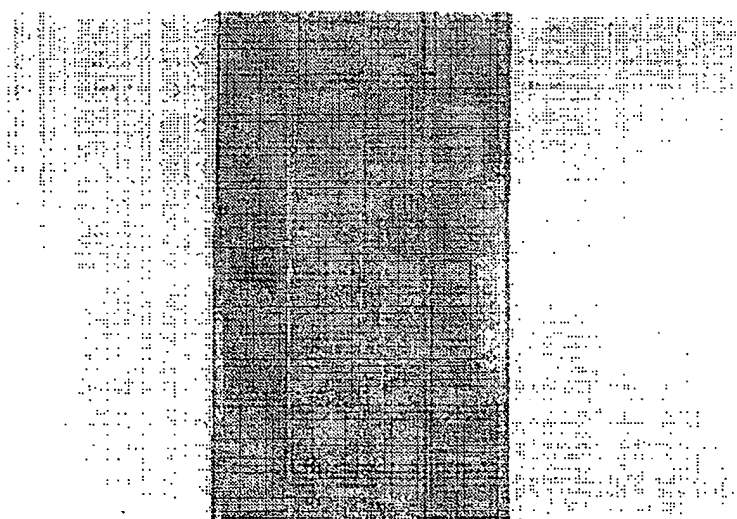
P N 2 3

第 3 2 図



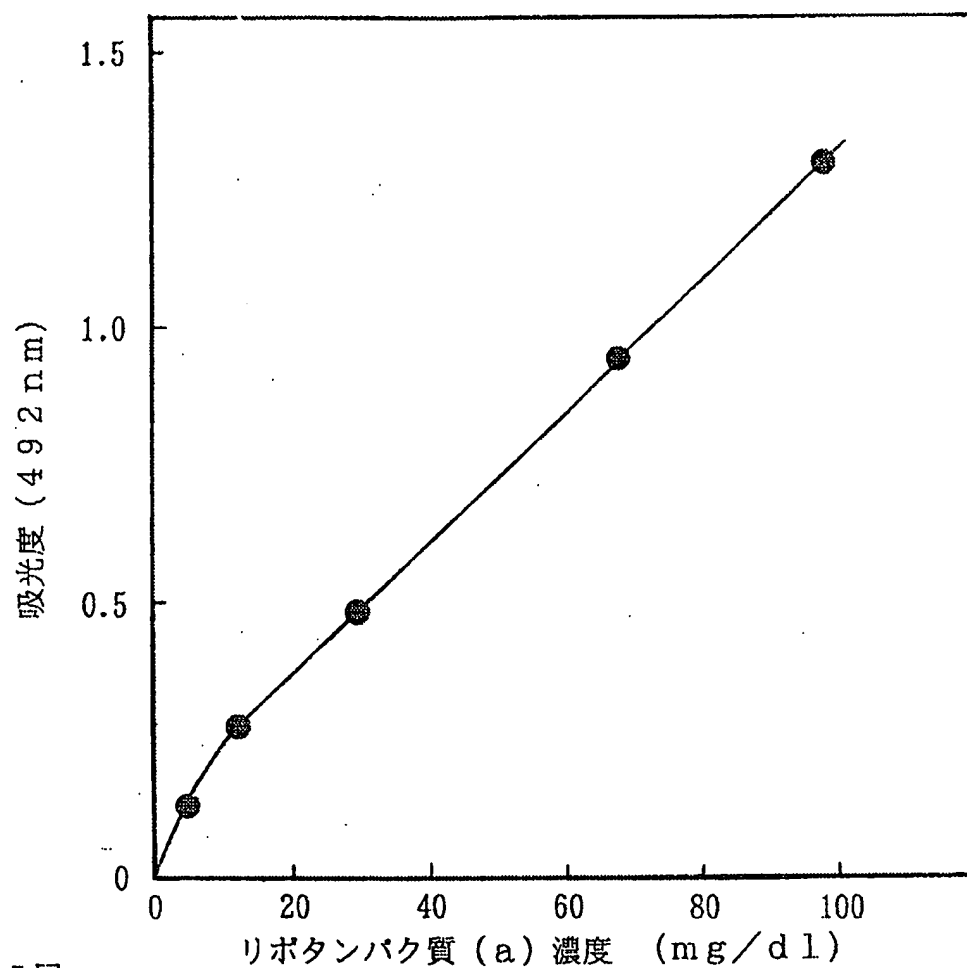
P N 2 3

第 3 3 図

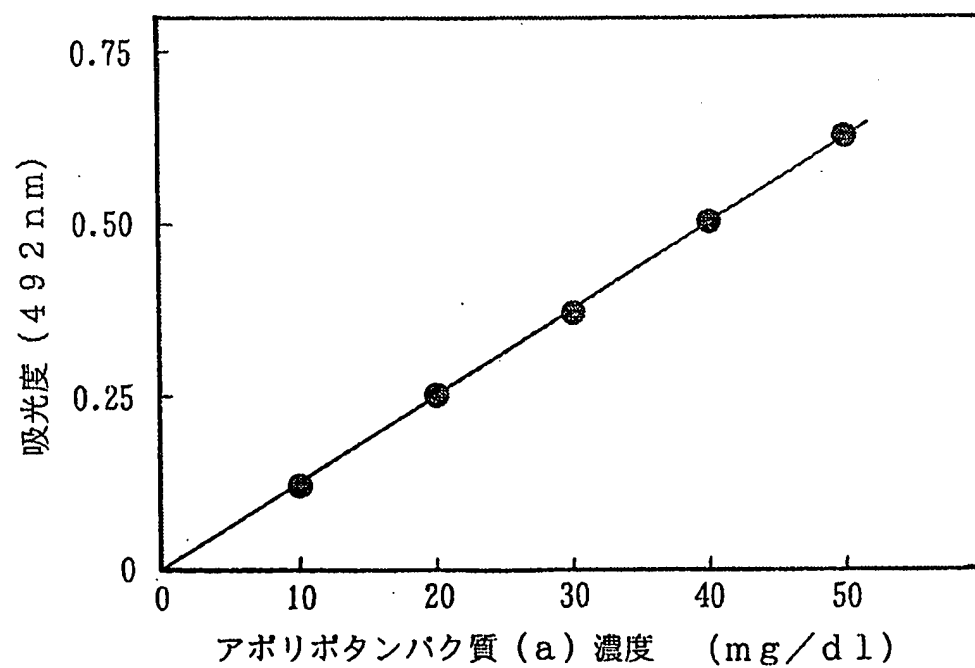


P N 2 3

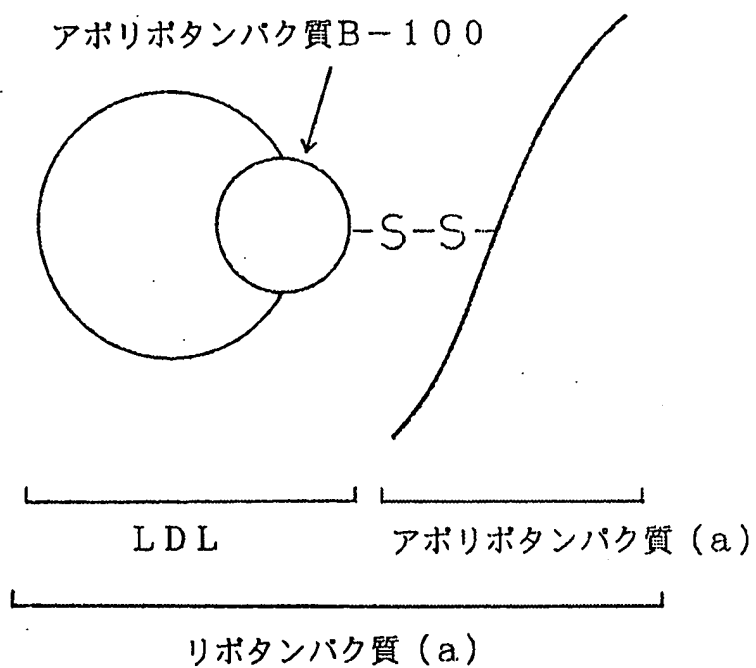
第 3 4 図



第 3 5 図



第 3 6 図



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01142

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>5</sup> C07K7/06, 7/08, G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>5</sup> C07K7/00, G01N33/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nature (London), Vol. 330, No. 6144 (1987) John W. McLean et al., "cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen" pp. 132-137	1-24
A	Biochem. J., Vol. 288, No. 1 (1992), Gi Chen et al., "Studies on epitopes on low-density lipoprotein modified by 4-hydroxynonenal. Biochemical characterization and determination" pp. 249-254	1-24
P,A	JP, A, 4-505609 (The Board of Regents of the University of Washington), October 1, 1992 (01. 10. 92), Pages 7 to 9 & WO, A, 90/05744	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C07K7/06, 7/08, G01N33/53

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> C07K7/00, G01N33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nature (London), 第330巻, 第6144号 (1987) John W McLean, et al [cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen] pp.132-137	1-24
A	Biochem J., 第288巻, 第1号 (1992) Gi Chen, et al [Studies on epitopes on low-density lipoprotein modified by 4-hydroxynonenal. Biochemical	1-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.11.93

国際調査報告の発送日

02.12.93

名称及びて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

前田 憲彦

4H

8318

電話番号 03-3581-1101 内線 3443



C. (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, A	<p>characterization and determination」 pp.249-254</p> <p>JP, A, 4-505609 (ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ワシントン), 1. 10月. 1992 (01. 10. 92), 第7頁-第9頁 &amp; WO, A, 90/05744</p>	1-24